

IN VITRO-MESSUNGEN
INTERSTITIELLER KATIONENKONZENTRATIONEN
MIT IONENSENSITIVEN MIKROELEKTRODEN
AN GANGLION CERVICALE SUPERIUS,
NERVUS VAGUS UND NERVUS OPTICUS
DER RATTE

Johann Förstl

1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0113

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof Dr. G. ten Bruggencate

Prof Dr. E. Gerlach

Prof Dr. K. Thureau

IN VITRO-

MESSUNGEN INTERSTITIELLER KATIONENKONZENTRATIONEN MIT
IONENSENSITIVEN MIKROELEKTRODEN AN GANGLION CERVICALE
SUPERIUS, NERVUS VAGUS UND NERVUS OPTICUS DER RATTE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johann Förstl

aus

München

1983

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 2. 1983



INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG

B. METHODE

1. Präparation
2. Elektrische Stimulation und Ableitung in vitro
3. Eigenschaften der verwendeten Ionenaustauscher
4. Herstellung ionensensitiver Mikroelektroden, Verstärkung und Abbildung der Ionenpotentiale
5. Lösungen und Pharmaka

C. ERGEBNISSE

1. Effekte repetitiver elektrischer Stimulation
 - 1.1. Ruhewerte der interstitiellen Kationenkonzentrationen
 - 1.2. Ganglion cervicale superius
 - 1.3. Nervus vagus und Nervus opticus
2. Inhibition der Na/K-Pumpe
 - 2.1. Ouabain
 - 2.2. Lithium und Vanadium
3. Pharmakologisch ausgelöste Veränderungen der interstitiellen Kationenkonzentrationen
 - 3.1. Cholinerge Substanzen
 - 3.2. GABA

D. DISKUSSION

1. Kurze Bemerkung zur Methode
2. Welche Strukturen beteiligen sich an einer stimulationsbedingten Kationenumverteilung?
3. Welche Mechanismen führen zu einer Wiederherstellung der Kationenruhekonzentrationen?
4. Welche funktionelle Bedeutung könnten die gemessenen Veränderungen der interstitiellen Kationenkonzentrationen an Ganglion und Nerv besitzen?
5. Ausblick

E. ZUSAMMENFASSUNG

F. LITERATURVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG

Seit langem war bekannt, daß bei neuronaler Erregung und synaptischer Aktivität transmembranale Ionengradienten zwischen Intrazellulärraum und Interstitium ausgenützt werden. Die Konsequenzen dieser Prozesse für das intra- und extrazelluläre Ionenmilieu in komplexen neuronalen Strukturen wurden allerdings erst in den letzten Jahren meßbar. Dafür verantwortlich war die Entwicklung flüssiger Ionenaustauscherharze, die den Bau stabiler und hinreichend selektiver ionensensitiver Mikroelektroden ermöglichten. Derartige Mikroelektroden gestatten eine direkte und fortlaufende Registrierung aktueller, sich rasch verändernder Ionenkonzentrationen mit einer Zeitauflösung von 10 bis 100 ms. Die Austauscherharze standen anfangs nur für Kalium (126), dann auch für Calcium (85) und andere Ionen zur Verfügung (84).

Schwerpunkt der neurophysiologischen Anwendung von ionensensitiven Mikroelektroden waren Untersuchungen am Zentralnervensystem der Vertebraten (80). Dabei zeigte sich, daß repetitive Reizung vor allem in Regionen mit einem hohen Anteil unmyelinisierter Fasern zu einem Anstieg der extrazellulären freien Kaliumkonzentration von etwa 3 mmol/l auf 6 bis 10 mmol/l führte (14; 48; 58; 59; 61; 62; 72; 73; 82). Jedem Kaliumanstieg dieser Größenordnung folgte ein mehrere Minuten dauernder Abfall der interstitiellen Kaliumkonzentration unter den Ruhewert (47; 63; 124). In Regionen großer synaptischer und dendritischer Dichte begleitete den Kaliumanstieg eine Abnahme der interstitiellen Calciumkonzentration, so etwa am Neocortex (von 1,2 auf 0,8 mmol/l; (49)) oder am Cerebellum der Katze (82). Die Amplitude der registrierten Konzentrationsveränderungen war um so höher, je größer der Quotient aktiver Membranen zu interstitiellem Verteilungsraum war. Dabei überlagern sich axonale, prä- und postsynaptische Prozesse, deren Anteil wegen der Komplexität der Untersuchungsobjekte bisher nicht eindeutig geklärt werden konnte (115).

Neben Studien am Zentralnervensystem wurden bereits einzelne Messungen mit ionensensitiven Mikroelektroden am Interstitium vergleichsweise einfacher Organe unternommen. Die direkte Registrierung

eines γ -Aminobuttersäure (=GABA)-bedingten Anstieges der interstitiellen Kaliumkonzentration gelang erstmals am Spinalganglion der Ratte (22). Das war gleichzeitig die erste publizierte Untersuchung über direkte Messungen der interstitiellen Kationenkonzentrationen an einem Organ des peripheren Nervensystems von Vertebraten. In ersten entsprechenden Versuchen am Ganglion cervicale superius der Ratte wurde ein Zusammenhang zwischen dem stimulationsbedingten Kaliumanstieg und einer Zunahme des Sauerstoffverbrauchs entdeckt (37). Die nächste Studie am Ganglion cervicale superius, in der gleichzeitig Veränderungen der interstitiellen Calciumkonzentrationen gemessen wurden, unterstrich die Bedeutung energieverbrauchender Ionenpumpen für die Regulation der extrazellulären Kaliumkonzentration durch den Nachweis höherer Kaliumruhwerte und größerer stimulationsbedingter Anstiege sowie eines geringeren Abfalles der Kaliumkonzentration nach der Reizung unter dem Einfluß von Ouabain (38).

Eine systematische und vergleichende Untersuchung einfacher neuronaler Strukturen mit kationensensitiven Mikroelektroden stand bisher noch aus, obwohl gerade diese Präparate viele Vorteile für eine Detailanalyse bieten. Das Ganglion cervicale superius kann als Modell eines unmyelinisierten Nerven mit interponierten Synapsen angesehen werden (33; 75; 91). Nervus vagus und Nervus opticus bieten sich als Modelle eines weitgehend unmyelinisierten bzw. myelinisierten Nerven an. Der cervicale Vagus der Ratte enthält mehr als 90% unmyelinisierter Fasern (17; 89). Das Summenaktionspotential des Vagus zeigt schnelle A- und B- sowie langsame C-Faser-Wellen. Die unmyelinisierten Axone sind für die langsam fortgeleiteten Aktionspotentiale verantwortlich. Sie zeigen eine höhere Reizschwelle als die schnelleleitenden myelinisierten Axone. Diese können daher selektiv stimuliert werden (24; 25; 29). Am Nervus opticus wurden elektronenmikroskopisch zahlreiche myelinisierte Nervenfasern dargestellt, daneben nur vereinzelt marklose oder markarme, die sich aber nicht mit Sicherheit von Astrocytenfortsätzen unterscheiden ließen (76). Andere Autoren beschrieben ausschließlich myelinisierte Axone am Opticus (32). Vagus und Opticus waren bisher noch nie mit ionensensitiven Mikroelektroden untersucht worden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine in vitro Studie der interstitiellen Kationenkonzentrationen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen. Abschnitt 1 beschreibt die Veränderungen der interstitiellen Kalium- und Calciumkonzentrationen durch repetitive elektrische Stimulation bei verschiedenen Temperaturen und variierten Ionenruhekonzentrationen. In Abschnitt 2 werden die Effekte der Na/K-Pumpenblocker Ouabain und Lithium auf das extrazelluläre Ionenmilieu dargestellt. Die Arbeit von Galvan et al. (38) wurde durch den Gebrauch mehrerer verschiedener Ouabainkonzentrationen und die Untersuchung des Nervus vagus erweitert. Die Verwendung des unmyelinisierten Nerven zur Analyse der Lithiumwirkung beansprucht besonderes Interesse, da an diesem Substrat die Hemmung einer elektrogenen Ionenpumpe durch Lithium erstmals nachgewiesen (102) und wiederholt überprüft (92; 93), neuerdings aber wieder in Frage gestellt wurde (114). Die Ergebnisse pharmakologischer Stimulation mit Carbachol und GABA werden in Abschnitt 3 mitgeteilt. Carbachol war als nicotinerge Substanz Gegenstand zahlreicher pharmakologischer Untersuchungen am Ganglion cervicale superius (10; 12; 14; 109). GABA ist eine der bestuntersuchten Transmittersubstanzen (60; 104). GABA-Rezeptoren wurden auch an Ganglion cervicale superius (44) und Nervus vagus (11) gefunden. Die Effekte von GABA, Carbachol und Lithium wurden an Ganglien und Nerven mit elektrophysiologischen Techniken, wie der Ableitung von Gliapotentialen oder mit Hilfe radioaktiv markierter Ionen, untersucht. Die direkte Messung der zugrundeliegenden Ionenveränderungen stellt eine wesentliche methodische Ergänzung dar.

Nach einer kurzen Bemerkung zur Methode soll in der Diskussion versucht werden, Antwort auf folgende Fragen zu geben:

a) Aus welchen Strukturen werden während neuronaler Stimulation Kationen ins Interstitium freigesetzt bzw. in welche werden sie aufgenommen? Wie groß ist der Beitrag prä- und postsynaptischer Strukturen, wie groß der Beitrag myelinisierter und unmyelinisierter Fasern zu den registrierten Veränderungen der Ionenkonzentrationen?

b) Welche Mechanismen sind nach Beendigung der Stimulation an der Wiederherstellung der Ruhekonzentrationen beteiligt? Handelt es sich dabei bevorzugt um passive oder um aktive Prozesse, d. h. um Diffusionsvorgänge oder die Effekte temperaturabhängiger und durch Ouabain hemmbarer Ionenpumpen?

c) Welche funktionelle Bedeutung könnten die nachgewiesenen Veränderungen der interstitiellen Kationenkonzentrationen im peripheren Nervensystem besitzen?

B. METHODE

1. Präparation

Zur Präparation von Ganglion cervicale superius und Nervus vagus wurden Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 250 bis 300 g durch intraperitoneale Urethan-Injektion (1,5 g/kg Körpergewicht) narkotisiert. Die ventrale Halsregion der Ratten wurde unter einem Operationsmikroskop (Leitz; maximale Vergrößerung 40 x) freigelegt, Muskeln und Faszien soweit beseitigt, daß Ganglion und Vagus medial der Arteria carotis communis und interna von der oberen Thoraxapertur bis zur Schädelbasis freipräpariert und der schonenden Entnahme zugänglich waren. Die Operationsdauer betrug etwa 15 min. Die Neuralscheiden wurden entfernt, um eine suffiziente Sauerstoffversorgung der Präparate zu gewährleisten und den Einstich der ionensensitiven Mikroelektroden zu erleichtern. Die Entnahme eines circa 1 cm langen intrakraniellen Teils des Nervus opticus erfolgte binnen 30 s nach Dekapitierung der Ratten. Schädeldach und Großhirnhemisphären wurden zunächst unter Zurücklassung des Chiasma nervi optici abgetragen. Danach wurden Chiasma und Opticus exziiert und aus der Meningealhülle befreit.

2. Elektrische Stimulation und Ableitung in vitro

Die Präparate lagen während der Versuche in einer Plexiglaskammer (20 x 15 x 6 mm), die von einer Rollerpumpe (Watson & Marlow) kontinuierlich mit oxygenierten Lösungen gespült wurde. Das Flüssigkeitsvolumen der Kammer betrug etwa 1,5 ml bei einem regulierbaren Durchfluß von 5 - 15 ml/min. Ein Wärmesystem (Thermomix 1420) kontrollierte die Temperatur der Versuchskammer (25°C bzw. 37°C). Die Enden der Präparate wurden in zwei gläserne Saugelektroden fixiert (Abb. 2), die an Mikromanipulatoren (Narashige) angebracht waren. Stimuliert wurde mittels zweier chlorierter Silberdrähte an einer der beiden Saugelektroden. Ganglion und Nervus opticus wurden bei der

repetitiven elektrischen Stimulation supramaximal gereizt, d. h. mit einer Reizstärke, die zu maximalen Summenpotentialen (s. u.) und größten Veränderungen der interstitiellen Ionenkonzentrationen bei der betreffenden Stimulationsfrequenz führten. Dazu waren meist Reizspannungen von 20 V bei einer Reizpulsdauer von 0,3 ms erforderlich. Am Nervus vagus wurden zur selektiven Stimulation der myelinisierten A- und B-Fasern Reizspannungen von weniger als 10 V eingesetzt.

Summenpotentiale wurden über chlorierte Silberdrähte der zweiten Saugelektrode differentiell abgeleitet und verstärkt. Ihre Abbildung erfolgte auf einem Kathodenstrahloszillographen (Tektronix 565; AC-gekoppelt), dessen Schirmbild auf 35 mm Film kopiert werden konnte.

3. Eigenschaften der verwendeten Ionenaustauscher

Selektive Ionenaustauscher funktionieren wie semipermeable Membranen. Daher können ihre elektrochemischen Eigenschaften durch eine Abwandlung der Nernstschen Gleichung, die Nikolsky-Gleichung, beschrieben werden (26):

$$V_{x+y_i} = A \log (x + \sum_i K_i y_i) + B;$$

Die Zeichen haben folgende Bedeutung:

V_{x+y_i} = gemessenes Potential in mV;

A = Elektrodensensitivität;

x = Konzentration des zu messenden Ions;

y_i = Konzentration eines mit der Messung von x interferierenden "Störions" i;

K_i = Selektivitätskoeffizient des Ionenaustauschers für das Ion i gegenüber dem Ion x (je kleiner dieser Koeffizient, desto geringer der Betrag des Terms $K_i y_i$ und damit der Störionen);

B = Summe konstanter Potentiale zwischen Ionenaustauscher und Erdelektrode;

Tabelle 1 zeigt die Widerstände (R) und Zeitkonstanten (τ) der verwendeten Ionenaustauscher, sowie die Selektivitätskonstanten (K_i) gegenüber verschiedenen Störionen (i). Es ergibt sich, daß der Corning Kaliumionenaustauscher ($x = K^+$) einen ungünstigen Selektivitätskoeffizienten (K_i) gegenüber cholinergen Substanzen wie Acetylcholin oder Carbachol besitzt. Um also sicher zu gehen, daß tatsächlich Kalium- und nicht etwa AcetylcholinKonzentrationen gemessen wurden, mußte auf den Valinomycin-Ionenaustauscher für Kalium zurückgegriffen werden, da dieser einen günstigeren Selektivitätskoeffizienten gegenüber Carbachol und Acetylcholin besitzt. Wegen des Vorteils einer kürzeren Zeitkonstante wurde jedoch der Corning-Ionenaustauscher im allgemeinen vorgezogen, da er zur Registrierung rascher Veränderungen der Kaliumkonzentration besser geeignet war.

Nach Beendigung der Versuche wurden die ionensensitiven Mikroelektroden in der Experimentierkammer unter Beibehaltung aller Versuchsbedingungen (Temperatur, Durchgasung, Durchflußrate) mit Kalibrierungslösungen im Bereich geeigneter Konzentrationen geeicht. Als Beispiel einer Eichkurve siehe Abb. 1. Den bekannten Kaliumkonzentrationen der Eichlösungen (Abszisse) wurden die registrierten Potentialsprünge zugeordnet (Ordinate). Die Steigung der Eichkurve lag geringfügig unter dem theoretischen Maximalwert von 60 mV für Kaliumelektroden und 30 mV für Calciumelektroden. Diese Werte errechnen sich nach der Nernstschen Gleichung für eine Konzentrationsveränderung des ein- bzw. zweiwertigen Ions um das Zehnfache bei einer Temperatur von 37°C.

Die gemessenen Ionenpotentiale wurden durch lineare Regression rechnerisch in entsprechende Ionenkonzentrationen überführt. Damit erübrigte sich eine gesonderte Betrachtung der tatsächlich registrierten Kalium-"aktivitäten".

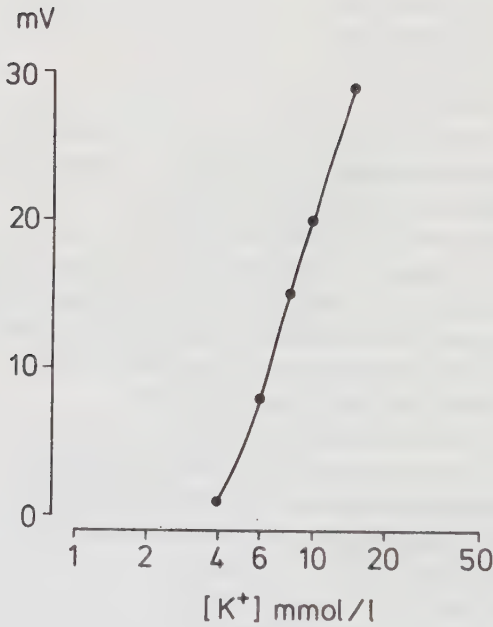


ABB. 1: Eichung einer kaliumsensitiven Mikroelektrode.

Die Eichlösungen enthielten 4, 6, 8, 10 und 15 mmol/l Kalium (Abszisse). Ein Wechsel der Eichlösungen veränderte das gemessene Ionenpotential der kaliumsensitiven Mikroelektrode (Ordinate).

Die Ergebnisse wurden im Text und graphisch meist dargestellt als Mittelwert $\pm$ Standardfehler:

$$\bar{x} \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n(n-1)}} ;$$

Die Zeichen haben folgende Bedeutung:

$\bar{x}$ = Mittelwert;

$\sum_{i=1}^n$ = Summe der Meßwerte von 1 bis n;

n = Zahl der Daten;

x_i = einer der Datenwerte von 1 bis n;

Unter der Annahme einer Normalverteilung wurde zur Prüfung der Signifikanz der zweiseitige unverbundene t-Test für paarige oder für unverbundene Stichproben verwendet (41).

4. Herstellung ionensensitiver Mikroelektroden, Verstärkung und Abbildung der Ionenpotentiale.

Aus Thetaglas (Borosilikatröhren mit einer Trennwand; Herst. Clark Inc.) wurden doppelläufige Elektroden mit einer ionensensitiven und einer Referenzseite hergestellt. Zu bestimmten Zwecken wurden dreiläufige Elektroden mit zwei ionensensitiven und einer Referenzseite verwendet.

In die mit Ionenaustauscher zu füllenden Kapillaren (Spitzendurchmesser 1,5 bis 3 μm) wurde bei einer Temperatur von 200°C vierprozentiges Dimethylchlorosilan injiziert. Silan reduziert die Oberflächenspannung zwischen dem hydrophilen Borosilikat und den hydrophoben Ionenaustauscherharzen. Damit war das Vordringen einer 0,5 mm langen Austauschersäule in die Spitze der silanisierten ionensensitiven Elektrodenseite erleichtert, und das Fließen von Leckströmen entlang nicht benetzter Stellen wurde verhindert (19).

Die kalium- und calciumsensitiven Liganden wurden mit 150 mmol/l KCl bzw CaCl_2 überschichtet. Die Referenzseite der Elektroden war ebenso wie die ionensensitive Seite über chlorierte Silberdrähte mit elektrodennahen Vorverstärkern verbunden. Bei der Füllung der Referenzseite mit 150 mmol/l NaCl wurden Diffusionspotentiale in Kauf genommen unter der Annahme sie seien klein und konstant (61).

Die ionensensitive Elektrodenseite mißt die Differenz der Grenzflächenpotentiale an beiden Enden der Austauschersäule und weitere elektrische Potentiale an der Elektroden Spitze, die durch Subtraktion des Referenzpotentials eliminiert werden können. Ionenpotentiale und Referenzpotentiale wurden differentiell verstärkt (Eingangswiderstände des Differenzverstärkers: ionensensitive Seite 10^{14} Ohm; Referenzseite 10^{11} Ohm) und auf einem Potentiometerschreiber (Rikadenki-Toshin) registriert (Abb. 2).

Alle Messungen erfolgten in einem Faraday-Käfig gegen eine indifferente Erdelektrode. Diese bestand aus einem chlorierten Silberdraht in 150 mmol/l NaCl-Agar und war mit der Krebslösung der Experimentierkammer verbunden.

5. Lösungen und Pharmaka

Die Elektrolytlösung nach Krebs-Henseleit (Tab. 2) hatten für den Nervus opticus als Bestandteil des Zentralnervensystems eine andere Zusammensetzung als für Ganglion cervicale superius und Nervus vagus (10), um den Liquor cerebrospinalis hinsichtlich seines niedrigen Kalium und Calciumgehalts nachzuahmen (55, 66). Sämtliche Lösungen wurden zur Aufrechterhaltung eines konstanten pH-Wertes von 7,4 mit Carbogen (95% O_2 ; 5% CO_2) durchgast. Selbst das Ganglion ist unter diesen Bedingungen noch während elektrischer Stimulation bei 37°C normoxisch (68). Bei einigen Experimenten wurde die Zusammensetzung der Elektrolytlösungen modifiziert. Die Addition höherer KCl- oder LiCl-Konzentrationen über 5 mmol/l wurde ausgeglichen durch eine äquimolare NaCl-Reduktion. Niedrigere Elektrolytkonzentrationen unter 5 mmol/l und Pharmaka wurden ohne osmotische Kompensation zugemischt.

ISOLATED RAT SUPERIOR CERVICAL GANGLION

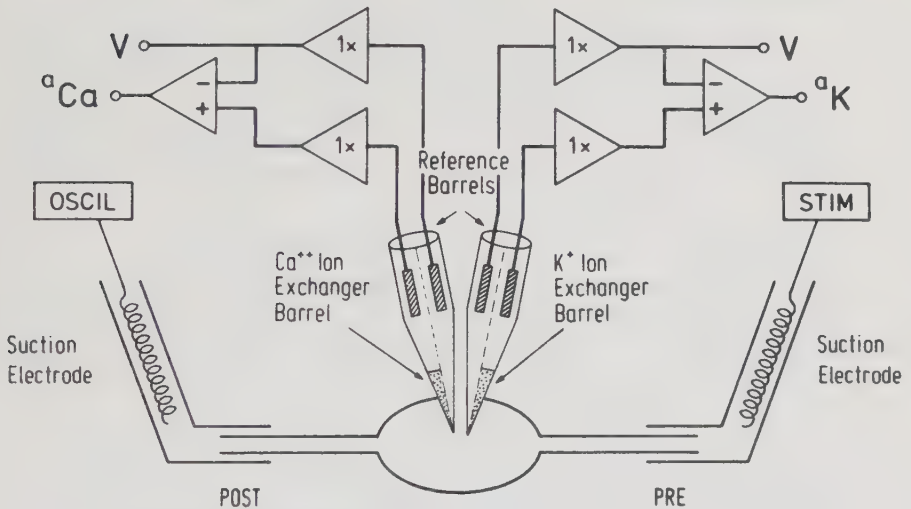


Abb. 2: Schema des Versuchsaufbaues.

Die präganglionären Fasern (PRE) eines Ganglion cervicale superius sind in die rechts dargestellte Glaselektrode (STIM) eingesaugt, die postganglionären Fasern (POST) in die links abgebildete Glaselektrode (OSCIL), die zur Potentialableitung mit einem Oszilloskop verbunden ist.

Bei dem dargestellten Versuch sind jeweils eine kalium- und calciumsensitive Mikroelektrode in das Ganglion eingestochen. Die Ionenpotentiale werden über zwei getrennte Differenzverstärker gemessen.

Tabelle 1: Eigenschaften der verwendeten Ionenaustauscher

Ionenaustauscher	x	R	τ	y_i	K_i
		in Ohm	in ms		
Corning Resin 477 317*	K^+	10^8-10^9	2-20	Na Acetylcholin**	2×10^{-2} 5×10^2
Valinomycin **	K^+	10^{11}	ca. 1000	Acetylcholin	10^{-2}
Calcium-Ligand***	Ca^{++}	$10^{10}-10^{11}$	4-150	K; Na	10^{-3}

x, y_i , K_i siehe Nikolsky-Gleichung im Text;

R = Elektrodenwiderstand bei mittlerem Spitzendurchmesser
(1,5 - 1,0 μm);

τ = Zeitkonstante nach Kapazitätskompensation;

* s. (47, 126)

** s. (79, 86)

*** s. (49, 85)

Tabelle 2:

Präparate	NaCl	NaHCO ₃	NaHPO ₄	KCl	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	D-Glucose	
Ganglion, Vagus	118	25	0	4,8	1,2	2,5	1,2	11	in mmol/l
Opticus	118	25	1,2	3,0	0	1,2	1,0	11	

Folgende Substanzen fanden Verwendung:

Carbachol, GABA, Na-Orthovandat, Ouabain, Pilocarpin, Tetrodotoxin (alle von Sigma-Chemicals), LiCl, Urethan (von Merck), Dimethylchlorosilan, (Macherey, Nagel & Co), Valinomycin, Calciumionenaustauscher (Prof. Dr. W. Simon, ETH Zürich) und Kaliumionenaustauscher Resin 477317 (Corning).

C. ERGEBNISSE

1. Effekte repetitiver elektrischer Stimulation

1.1. Ruhewerte der interstitiellen Kationenkonzentration

Die meisten Versuche wurden bei Konzentrationen von 2,5 bzw. 1,5 mmol/l CaCl_2 und 3 bzw. 6 mmol/l KCl in den Krebslösungen durchgeführt (Tab. 2.).

Der Einstich der ionensensitiven Mikroelektroden in die Präparate wurde unter mikroskopischer Kontrolle manuell mit Hilfe eines Mikromanipulators vorgenommen und führte stets zu Potentialveränderungen der ionensensitiven und der Referenzseite der Elektroden. Die unmittelbare zuverlässige Messung einer eventuellen Konzentrationsdifferenz von Kalium oder Calcium zwischen Krebslösung und Interstitium war daher nicht möglich. Im Ganglion cervicale superius und Nervus vagus veränderten sich nach dem Einstich die Kalium- und Calciumkonzentrationen bei einem Wechsel der betreffenden Ionenkonzentrationen in der Superfusion innerhalb von 5 min und erreichten die extern vorgegebenen Werte nahezu vollständig. Bei Variation von KCl zwischen 1 und 12 mmol/l und von CaCl_2 zwischen 3 und 12 mmol/l wurden die Extremwerte mit Abweichungen von weniger als 0,5 mmol/l im Interstitium der Präparate nachvollzogen. Der Extrazellulärraum äquilibrierte sich also nahezu vollständig mit der Superfusion. Daher war anzunehmen, daß nach Ablauf der oben genannten Einstichartefakte der Kalium- und Calciumkonzentrationen bei 25°C und 37°C den in der Krebslösung vorgegebenen Werten entsprachen.

1.2. Ganglion cervicale superius

Abbildung 3 zeigt die Effekte repetitiver, orthodromer, supramaximaler Stimulation mit denen das Ganglion bei 25°C in einminütigen Serien mit 1, 2 und 4 Hz gereizt wurde. Die Stimulation

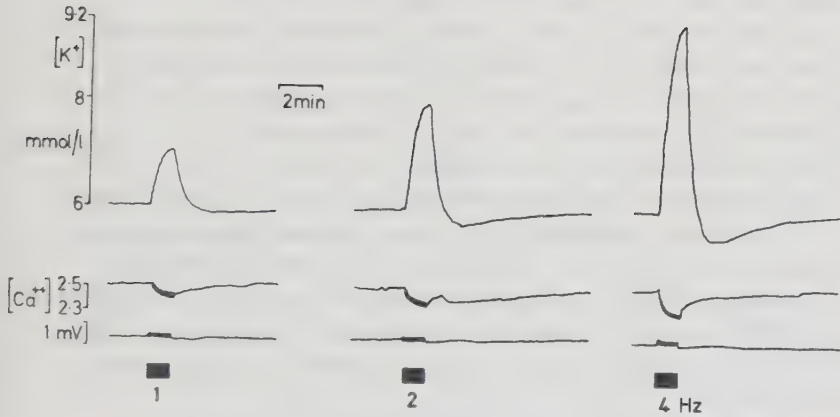


Abb. 3: Effekte orthodromer elektrischer Stimulation auf die interstitiellen Kationenkonzentrationen am Ganglion cervicale superius bei 25°C.

Gezeigt werden die reizinduzierten Kaliumanstiege und "undershoots" (obere Registrierung) sowie die Calciumabnahme (mittlere Registrierung) und das Referenzpotential einer Mikroelektrode (untere Registrierung) bei einminütiger Stimulation mit 1, 2 und 4 Hz (s. Balken, von links nach rechts).

mit 1 Hz führte am dargestellten Beispiel zu einem raschen Anstieg der interstitiellen Kaliumkonzentration von 6 auf maximal 7 mmol/l. Bei der höherfrequenten Stimulation mit 2 bzw. 4 Hz erfolgte ein entsprechend höherer Anstieg auf 8 bzw. 9,2 mmol/l. Nach Beendigung der elektrischen Reizung sank die Kaliumkonzentration nach 30 s unter die Ruhekonzentration von 6,0 mmol/l. Dieser "undershoot" dauerte einige Minuten und im Anschluß daran konnte die Ruhekonzentration erneut geringfügig, nämlich um weniger als 0,1 mmol/l überschritten werden. Bei größeren Kaliumanstiegen war auch die nachfolgende Konzentrationssenkung stärker ausgeprägt. Die interstitielle Calciumkonzentration fiel während der Stimulation mit 4 Hz von 2,5 auf 2,3 mmol/l ab. Die niedrigeren Stimulationsfrequenzen führten zu einem geringeren Abfallen der Calciumkonzentration. Ein Überschreiten der Calciumruhekonzentration im Anschluß an den Abfall wurde nur sehr selten registriert, erfolgte mit einer Verzögerung von mehreren Minuten und erreichte nie höherer Werte als 2,51 mmol/l. Damit lag es an der Grenze der Meßbarkeit.

Bei 37°C wurde am Ganglion die überhaupt größte, durch elektrische Reizung bedingte Calciumabnahme von 2,5 auf 2,2 mmol/l während Stimulation mit 32 Hz beobachtet (ohne Abb.). Ein noch stärkeres Abnehmen der interstitiellen Calciumkonzentration war durch Superfusion hoher KCl-Konzentrationen zu erzielen. Die akute Applikation von 50 mmol/l KCl bedingte eine Calciumabnahme von 2,5 auf $1,9 \pm 0,2$ mmol/l ($n = 4$; ohne Abb.). Dieser Effekt war durch 20 mmol/l $MgCl_2$ blockierbar.

Abbildung 4 faßt die bei 25°C und 37°C in mehreren Experimenten gemessenen Kaliumanstiege und -abnahmen zusammen und vergleicht die Ergebnisse von Ganglion und Nervus vagus. Während am Ganglion bei 25°C die größten durchschnittlich registrierten Kaliumanstiege von 6 auf 8,4 mmol/l durch Stimulation mit 16 Hz zu erzielen waren und höhere Frequenzen nur mehr zu geringeren Effekten führten, stieg die interstitielle Kaliumkonzentration bei 37°C durch Stimulation mit 32 Hz bis auf 10 mmol/l an. Bei gleicher Reizfrequenz fanden am Ganglion stärkere Konzentrationsänderungen statt als im Interstitium des Nervus vagus, in dem jedoch bei 25°C durch Stimulation mit 32 Hz noch ein größerer Anstieg (auf über 8,5 mmol/l) erzielt wurde als durch 16 Hz.

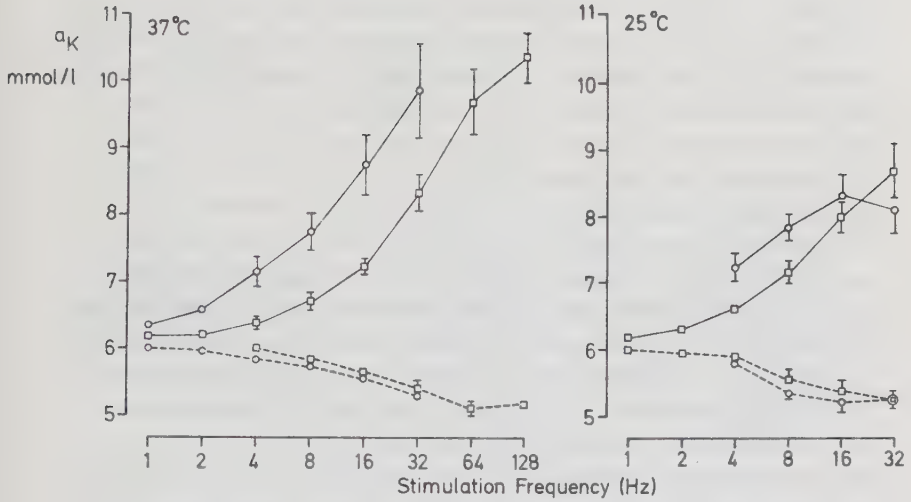
SCG^o and VAGUS NERVE[□]

Abb. 4: Beziehung zwischen Stimulationsfrequenz (1 - 128 Hz; Abszisse) und Amplitude der Kaliumanstiege (—) und "undershoots" (----) an Ganglion (o = SCG) und Vagus (□) bei 37°C (linke Graphik) und 25°C (rechte Graphik).
Mittelwerte $\pm$ Standardfehler; $n=3$;

Im Gegensatz zu Versuchen bei 25°C zeigte das Oszilloskopbild des ganglionären Summenpotentials bei 37°C auch nach fortgesetzter Stimulation mit 16 und 32 Hz keine Abflachung, d. h. auch bei der hohen Frequenz erfolgte eine unverminderte Erregungsüberleitung bei der höheren Temperatur. Der Ablauf der Konzentrationsveränderungen war bei 37°C gegenüber 25°C beschleunigt. Das Maximum des Kaliumanstiegs, die Rückkehr zur Ruhekonzentration und das Unterschwingen erfolgten bei 37°C etwa dreifach schneller. Die Zeit $t_{1/2}$, innerhalb derer die interstitielle Kaliumkonzentration nach Beendigung der Reizung zur Hälfte auf die Ruhekonzentration zurückgekehrte, war von 9 auf 3 s verkürzt.

Wie die Abbildung 5 Mitte zeigt, verhielt sich die Amplitude des reizinduzierten Kaliumanstiegs innerhalb der getesteten Grenzen nahezu umgekehrt proportional zur Kaliumruhekonzentration. Oberhalb von 10 mmol/l nahm die reizinduzierte Kaliumausschüttung am Ganglion stark ab. Bei einer externen Kaliumkonzentration von 12 mmol/l erfolgte kein deutlicher Anstieg mehr bei der Stimulation, auch ein Unterschwingen ohne vorangehenden Anstieg stellte sich nicht ein. Die Kalium-"undershoots" besaßen bei einer Ruhekonzentration von 6 mmol/l die größte Amplitude. Der Nervus vagus zeigte eine entsprechende Abhängigkeit von der extern vorgegebenen Kaliumruhekonzentration (Abb. 5, linke Graphik). Die Amplitude der Kaliumanstiege und -"undershoots" war am Vagus im Gegensatz zum Ganglion vollkommen unabhängig von der Calciumruhekonzentration. Am Ganglion cervicale superius waren die reizinduzierten Kaliumveränderungen bei einer höheren externen Calciumkonzentration von 5 mmol/l vergrößert, bei einer niedrigeren Ruhekonzentration von 1,25 mmol/l verkleinert im Vergleich zur Kontrolle (Ruhewert 2,5 mmol/l, Abb. 5 rechte Graphik). 50 mmol/l $MgCl_2$ beseitigten bei orthodromer elektrischer Stimulation das postganglionär abgeleitete Summenpotential beinahe vollständig, d. h. die synaptische Transmission war unter dieser Bedingung stark eingeschränkt. Dies führte zu einer Reduktion des Kaliumanstiegs um 25%. Da Magnesium in dieser hohen Konzentration nicht nur die synaptische Transmission, sondern auch die axonale Erregungsleitung beeinflusst, waren keine eindeutigen Rückschlüsse auf eine prä- oder postsynaptische Verminderung des Kaliumstroms durch $MgCl_2$ möglich (ohne Abb.).

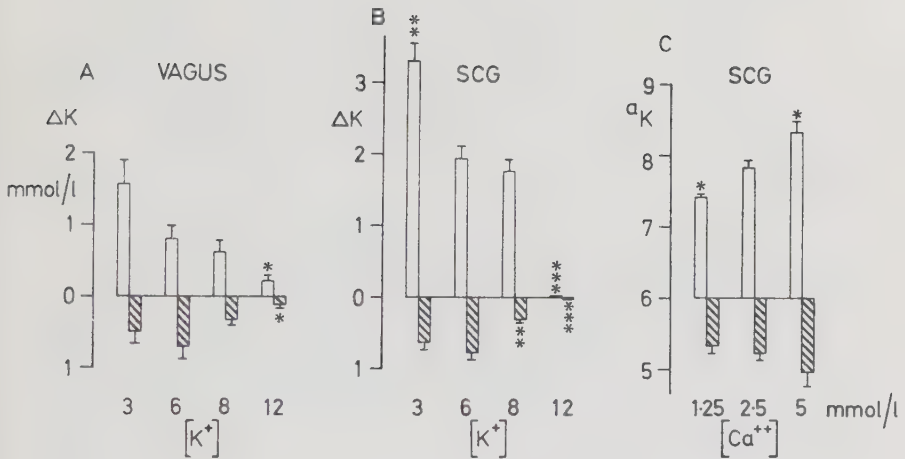


Abb. 5: Effekte variiert externer Kalium- (links; Mitte) und Calciumkonzentrationen (rechts) auf reizinduzierte Kaliumanstiege (leere Balken) und "undershoots" (schraffierte Balken) and Ganglion (SCG) und Vagus bei 25°C.

Am Vagus (linke Graphik) erfolgte die einminütige supramaximale Stimulation mit 16 Hz, am Ganglion (mittlere und rechte Graphik) orthodrom und mit 8 Hz.

Mittelwerte $\pm$ Standardfehler; $n \geq 3$.

Signifikante Unterschiede vom Vergleichswert (bei K^+ = 6 mmol/l und Ca^{++} = 2,5 mmol/l) traten auf mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***).

Repetitive antidrome elektrische Stimulation des Ganglion cervicale superius durch den Nervus caroticus internus führte nur zu sehr kleinen Kaliumanstiegen und zu keinen nachweisbaren Veränderungen der interstitiellen Calciumkonzentration. Die einminütige Reizung mit 32 Hz verursachte bei 25°C einen Anstieg von 6 auf $6,1 \pm 0,04$ mmol/l ($n = 4$; ohne Abb.). Durch höhere Frequenzen war kein deutlicher Effekt zu erzielen. Bei 37°C waren überhaupt keine Veränderungen der interstitiellen Kaliumkonzentration bei antidromer Stimulation zu verzeichnen.

Am Ganglion cervicale superius fand sich kein Unterschied zwischen Kaliummessungen mit dem Corning- und dem Valinomycin-Ionenaustauscher (Tab. 1). Wegen der hohen Kaliumselektivität des Valinomycinderivates darf davon ausgegangen werden, daß die Messung der Kationenkonzentration am Ganglion nicht wesentlich durch interferierende Substanzen, wie etwa Acetylcholin, verfälscht wurde. Der verwendete Calciumionenaustauscher zeichnete sich ohnehin durch eine hohe Calciumspezifität aus (Tab. 1.).

1.3. Nervus vagus und Nervus opticus

Bei der Besprechung der Abbildungen 4 und 5 wurde bereits auf einige Gemeinsamkeiten und Unterschiede der interstitiellen Veränderungen der Kaliumkonzentrationen an Ganglion und Nervus vagus hingewiesen. An beiden Präparaten war die Amplitude der "undershoots" abhängig von der Größe des vorausgegangenen Kaliumanstiegs und damit von der Stimulationsfrequenz (Abb. 3; 4). Abbildung 6 illustriert den Einfluß der Reizdauer auf die Größe und Länge des Unterschwingens der Kaliumruhekonzentration. Übereinandergezeichnet wurden die Ergebnisse eines Experiments, in dem die Reizdauer zwischen 0,5 und 4 min variiert wurde. Nach 0,5-minütiger Reizung mit 8 Hz sank die Kaliumkonzentration von 6 auf 5,6 mmol/l. Vierminütige Stimulation mit der gleichen Frequenz führte zu einer Kaliumabnahme auf 5,1 mmol/l. Die Zeit bis zur Rückkehr auf die Ruhekonzentration war mit 3 min gegenüber dem ersten Test

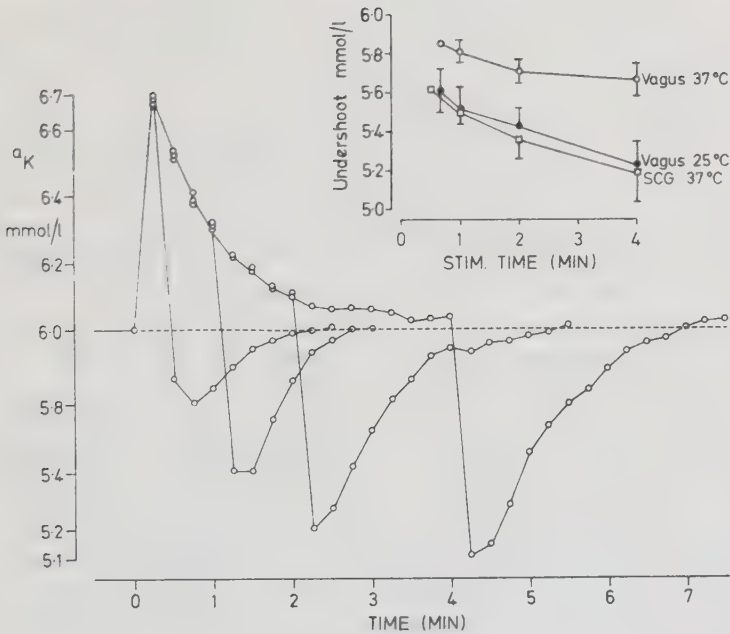


Abb. 6: Effekte variierteter Stimulationsdauer auf die Amplitude und Dauer der "undershoots" am Nervus vagus. Der Vagus wurde bei 25°C für 0,5, 1, 2 und 4 min mit 8 Hz stimuliert. Mehrere Registrierungen wurden übereinandergezeichnet. Die Reizstärke war supramaximal.

Kleine Abb.: Zusammenfassung der betreffenden Messungen an Ganglion (SCG) und Vagus.

Ordinate: Maximal erreichter "undershoot" in mmol/l.

Abszisse: Stimulationsdauer in min.

Mittelwerte $\pm$ Standardfehler; n=4.

Abb. 6 wurde bereits veröffentlicht (34).

verdoppelt. Eine Serie entsprechender Untersuchungen wurde am Ganglion und Nervus vagus durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 rechts oben zusammengefaßt. Es fanden sich übereinstimmend stärkere Abnahmen der Kaliumkonzentration nach längerer Stimulationsdauer.

Abbildung 7 zeigt eine Messung der interstitiellen Kalium- und Calciumkonzentration am Nervus vagus. Der Nerv wurde bei einer Temperatur von 25°C 2 Minuten lang mit 32 Hz supramaximal stimuliert. Da eine Kalium-Calcium-Dreifachelektrode verwendet wurde, darf wegen des registrierten Kaliumanstiegs von 6 auf über 8 mmol/l davon ausgegangen werden, daß sich auch die calciumsensitive Elektroden Seite im Interstitium des Nerven befand. Eine eindeutige Veränderung der interstitiellen Calciumkonzentration war am Nervus vagus während oder nach elektrischer Stimulation nicht nachzuweisen.

In Abb. 8 werden Veränderungen der Kaliumkonzentration gegenübergestellt, die am Nervus vagus durch selektive Reizung von A- und B-Fasern und durch supramaximale Reizung aller A-, B- und C-Fasern hervorgerufen wurden. Im ersten Teil des Experimentes (obere Registrierung) fand eine niedrige Reizspannung Verwendung, durch die nur Aktionspotentiale der myelinisierten A- und B-Fasern ausgelöst wurden (s. rechter oberer Bildrand). Einminütige Stimulation mit 4, 8 oder 16 Hz verursachte keine Kaliumanstiege über 6,2 mmol/l. Erhöhte Reizspannung erregte auch die unmyelinisierten C-Fasern mit höherer Reizschwelle (rechter unterer Bildrand). Stimulationsphasen gleicher Frequenz und Dauer führten bei der Aktivierung von C-Fasern zu Kaliumanstiegen bis auf 8 mmol/l (s. untere Registrierungen). Im Anschluß an die Reizung unterschritt die interstitielle Kaliumkonzentration den Ruhewert für mehrere Minuten. Eine Reihe dieser Untersuchungen wurde bei 25°C und 37°C durchgeführt, mit dem Ergebnis, daß die Erregung von A- und B-Fasern bei 25°C zu geringen Kaliumanstiegen führte, während bei 37°C keinerlei Abweichungen von der Ruhekonzentration zu registrieren waren. Aktivierung von A-, B- und C-Fasern bedingte stets deutliche Kaliumanstiege, die von ausgeprägten "undershoots" gefolgt waren.

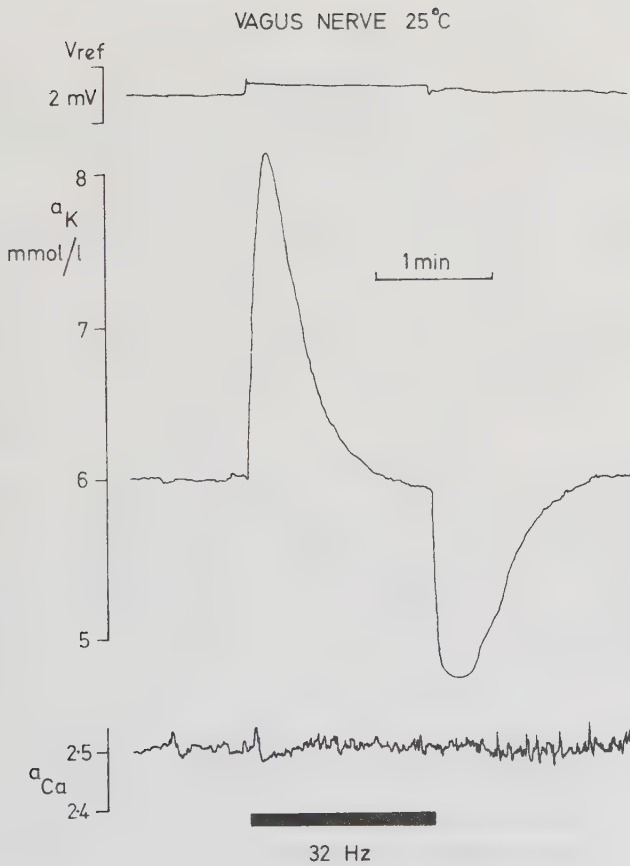


Abb. 7: Simultane Registrierung von Referenzpotential (V_{ref} , oben) der interstitiellen Kalium- (Mitte) und Calciumkonzentration (unten) am Nervus vagus bei 25°C während einer 2-minütigen Stimulation mit 32 Hz (Balken).

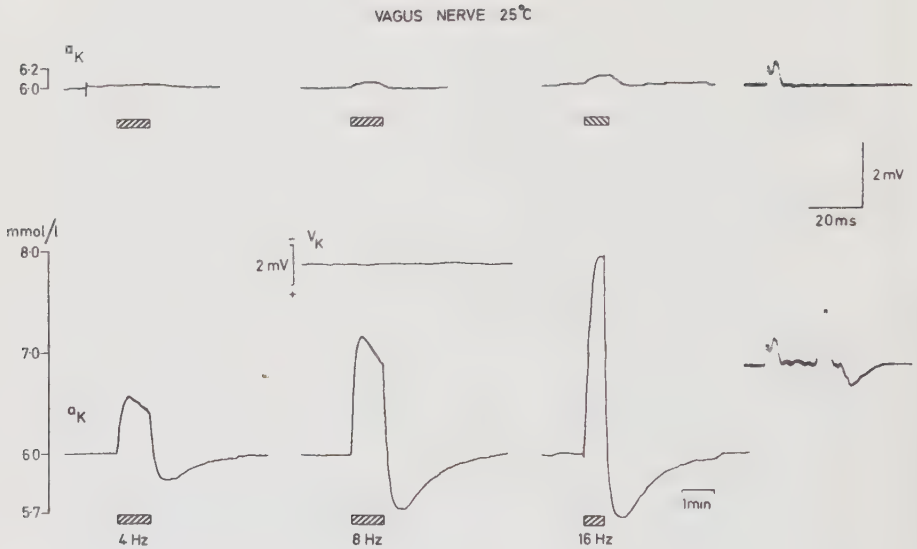


Abb. 8: Interstitielle Kaliumkonzentrationen am Vagus bei elektrischer Stimulation mit 4, 8 und 16 Hz (Balken) und 25°C. Rechnergemittelte Summenaktionspotentiale sind am rechten Bildrand dargestellt.

Ausschließliche Erregung von A- und B-Fasern führte zu den oben registrierten Veränderungen der Kaliumkonzentration.

V_K ist das Referenzpotential der darunter registrierten Kaliummessung bei supramaximaler Stimulation.

Abb. 8 wurde bereits veröffentlicht (34).

Der Nervus opticus besitzt ausschließlich myelinisierte Fasern. Abbildung 9 A zeigt Kaliummessungen am Opticus während einer Reizserie mit verschiedenen Frequenzen bei einer Temperatur von 37°C . Durch kurze Phasen hochfrequenter Stimulation mit 128 Hz wurden Kaliumanstiege von 3 auf 5,5 mmol/l ausgelöst. Kleine "undershoots" auf minimal 2,5 mmol/l folgten. Die zusammenfassenden Graphiken der Abbildung 9 B und C erweisen, daß niedrigere Reizfrequenzen bis zu 32 Hz bei 25°C zu größeren Veränderungen der Kaliumkonzentration führen als bei 37°C . Durch höhere Frequenzen, wie 64 und 126 Hz, werden aber bei der höheren Temperatur noch größere Kaliumanstiege erzielt, als durch die entsprechenden Frequenzen bei 25°C auszulösen sind. Im Vergleich zum Vagus (s. Abb. 4) bedarf es am Nervus opticus höherer Reizfrequenzen, um maximale Kaliumanstiege zu erzeugen.

In einigen Experimenten an Ganglion, Vagus und Opticus wurde Tetrodotoxin verwendet, um exemplarisch nachzuweisen, daß es sich bei den mit den ionensensitiven Mikroelektroden gemessenen Ionenpotentialen tatsächlich um geringe Veränderungen der Ionenkonzentrationen und nicht etwa um elektrische Artefakte handelte. Tetrodotoxin hemmt die Aktivierbarkeit der für das Aktionspotential verantwortlich Na-Kanäle und verhindert dadurch eine neuronale Excitation (78). Bereits geringe Tetrodotoxinkonzentrationen von 350 nmol/l beseitigten die stimulationsbedingten Kaliumveränderungen vollständig (Abb. 10). Die Tetrodotoxinwirkung war bei einer entsprechenden Auswaschdauer teilweise reversibel.

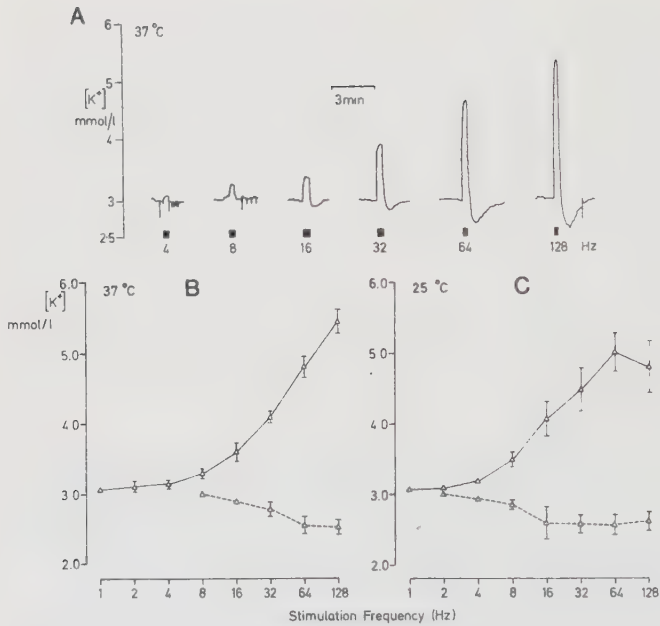


Abb. 9 A: Interstitielle Kaliumkonzentrationen während der Stimulation des Nervus opticus mit Frequenzen von 4 bis 128 Hz (Balken) bei 37°C.

B, C: Zusammenfassung der Messungen am Opticus bei 37°C und 25°C.

Mittelwerte $\pm$ Standardfehler; $n \geq 3$.

Abb. 9 wurde bereits veröffentlicht (34).

OPTIC NERVE 37°C

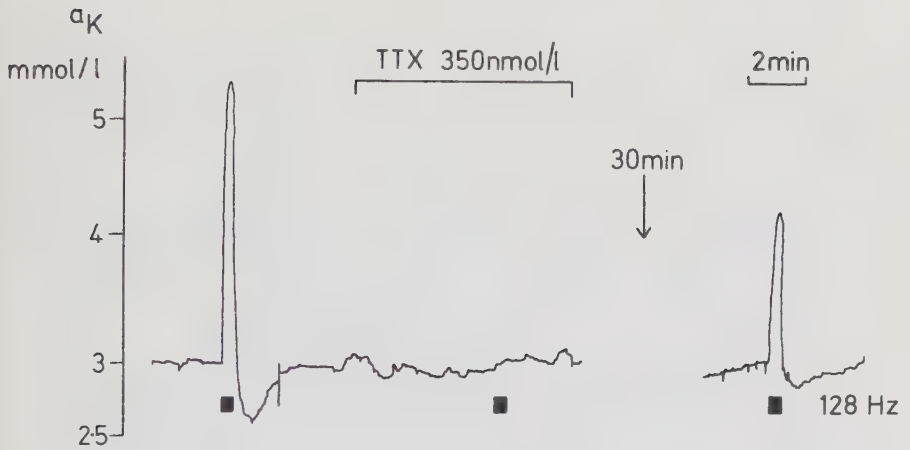


Abb. 10: Repetitive elektrische Stimulation der Nervus opticus bei 37°C mit 128 Hz (Balken) unter Normalbedingungen in Krebslösung (links), nach 5-minütiger Applikation von 350 nmol/l Tetrodotoxin (TTX; Mitte) und nach 30 min Auswaschen mit Krebslösung (rechts).

2. Inhibition der Na-K-Pumpe

2.1 Ouabain

Ouabain wurde in verschiedenen Konzentrationen auf das Ganglion cervicale superius und Nervus vagus appliziert, um die Auswirkungen einer Hemmung der Ionenpumpe auf die interstitielle Kationenkonzentrationen in Ruhe und bei elektrischer Stimulation zu studieren.

Die ionensensitiven Mikroelektroden erwiesen sich als nicht Ouabain-sensitiv, d. h. sie zeigten keinen Potentialsprung zwischen einer Lösung mit und ohne Ouabain. Die Kalium- und Calciumempfindlichkeit, also die Steilheit der Eichkurve, wurde durch Ouabain nicht beeinflusst (ohne Abb.).

Ohne elektrische Reizung kam es unter Ouabain zu einer Anhebung der Kaliumruhekonzentration. Abbildung 11 dokumentiert den Effekt von 300 $\mu\text{mol/l}$ Ouabain bei 25°C am Ganglion. Die Ruhekonzentration erreichte 5 min nach Beginn der Applikation einen Wert von 6,5 mmol/l. Während einer Stunde folgte ein langsamer Rückwärtsgang auf 6,25 mmol/l. Zehn Minuten nach Beginn des Auswaschens mit normaler Krebslösung war die ursprüngliche Kaliumkonzentration von 6 mmol/l wiedererlangt. Die interstitielle Calciumkonzentration war keinen nachweisbaren Veränderungen durch Ouabain unterworfen.

Abbildung 12 zeigt die Effekte von 300 $\mu\text{mol/l}$ Ouabain auf die reizinduzierten Kalium- und Calciumveränderungen am Ganglion (rechte Bildhälfte) im Vergleich zur Kontrolle (linke Bildhälfte). Drei wesentliche Wirkungen auf die interstitielle Kaliumkonzentration waren zu beobachten. Erstens war der reizinduzierte Kaliumanstieg auf 11,3 mmol/l erhöht (Kontrolle 9,4 mmol/l bei Reizung mit 4 Hz) und die Anstiegssteilheit war verlangsamt (in der Abb. nicht sicher zu beurteilen). Zweitens erfolgte die Rückkehr zur Ruhekonzentration verzögert. Die Zeit $t_{1/2}$, innerhalb derer Kalium nach Beendigung der Stimulation zur Hälfte auf die Ruhekonzentration zurückgekehrt war, wurde durch Ouabain verlängert. Drittens war der Kalium-"undershoot" beseitigt. Die einzig erkennbare Wirkung auf die interstitielle Calciumkonzentration

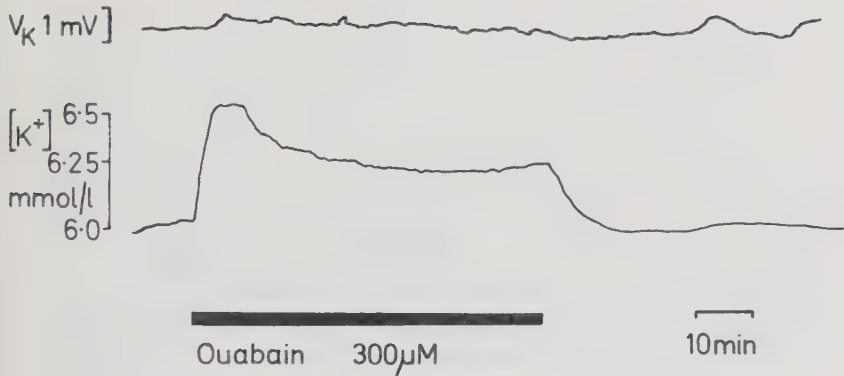


Abb. 11: Effekt von 300 $\mu\text{mol/l}$ Ouabain auf die Kalium-
 ruhekonzentration am Ganglion cervicale superius (SCG) bei 25°C.
 Das Ganglion wurde nicht elektrisch stimuliert.
 V_K ist das Referenzpotential.
 Applikationsdauer s. Balken.

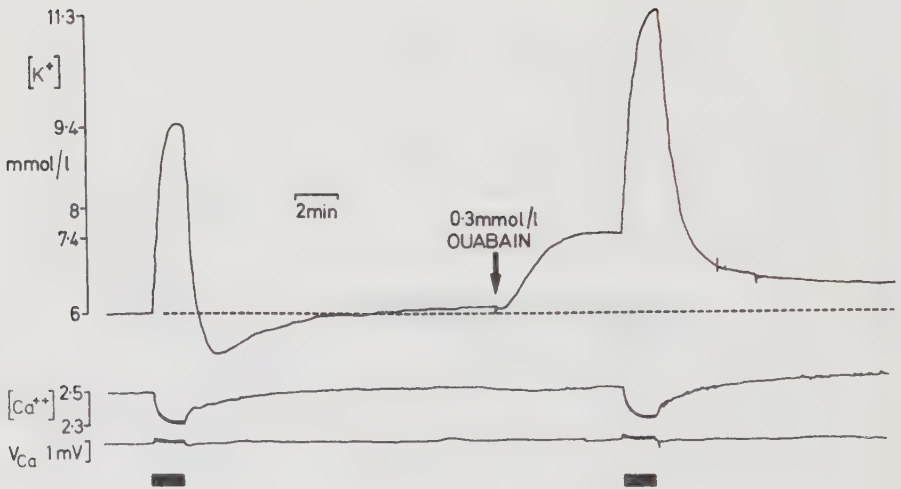


Abb. 12: Effekt von 300 $\mu\text{mol/l}$ Ouabain (Beginn der Applikation s. Pfeil) auf reizinduzierte Veränderungen der interstitiellen Kalium- und Calciumkonzentrationen bei Stimulation des Ganglions mit 4 Hz (Balken) bei 25°C. V_{Ca} ist das Referenzpotential der calciumsensitiven Mikroelektrode.

war eine geringe Verkleinerung der stimulationsbedingten Calciumabnahme bei 25°C von 2,5 auf $2,33 \pm 0,02$ mmol/l bei 300 μ mol/l Ouabain. Die Stimulation mit 4 Hz führte bei Kontrolle zu einer Abnahme auf $2,26 \pm 0,03$ mmol/l ($n = 5$; $P < 0,2$).

In Abbildung 13 werden die Effekte verschiedener Ouabainkonzentrationen verglichen. Auf das Ganglion cervicale superius wurden bei sonst identischen Stimulationsbedingungen (25°C; 4 Hz) nacheinander Lösungen mit 30, 100, 300 und 1000 μ mol/l Ouabain appliziert. Die Ergebnisse einzelner repetitiver Reizungen sind übereinandergezeichnet. Es zeigte sich, daß alle im letzten Absatz genannten Ouabain-Effekte bei der höchsten Konzentration des Pumpenblockers am ausgeprägtesten waren.

Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Meßergebnisse, die bei 25°C und 37°C an Ganglion und Vagus über die Ouabainwirkung gewonnen wurden. Kaliumruhekonzentrationen und -anstiege und die Zeit $t_{1/2}$ werden aufgeführt. $t_{1/2}$ wird von allen Parametern am signifikantesten durch Ouabain beeinflußt. Sämtliche Ouabaineffekte waren bei beiden Temperaturen qualitativ gleich und zeigten sich am Ganglion deutlicher als am Vagus.

Die Ouabainwirkungen waren teilweise reversibel. Eine erneute Applikation von Ouabain im gleichen Experiment führte zu geringerer initialer Anhebung der Kaliumruhekonzentration. Vergrößerung des reizinduzierten Kaliumanstieges, verzögerter Rückkehr zur Kaliumruhekonzentration und Beseitigung der "undershoots" waren konstant reproduzierbar. Diese Effekte sind durch eine Hemmung der Na-K-Pumpe erklärbar. Daher können sie als Hinweis auf entsprechende Wirkungsmechanismen anderer Substanzen verwendet werden.

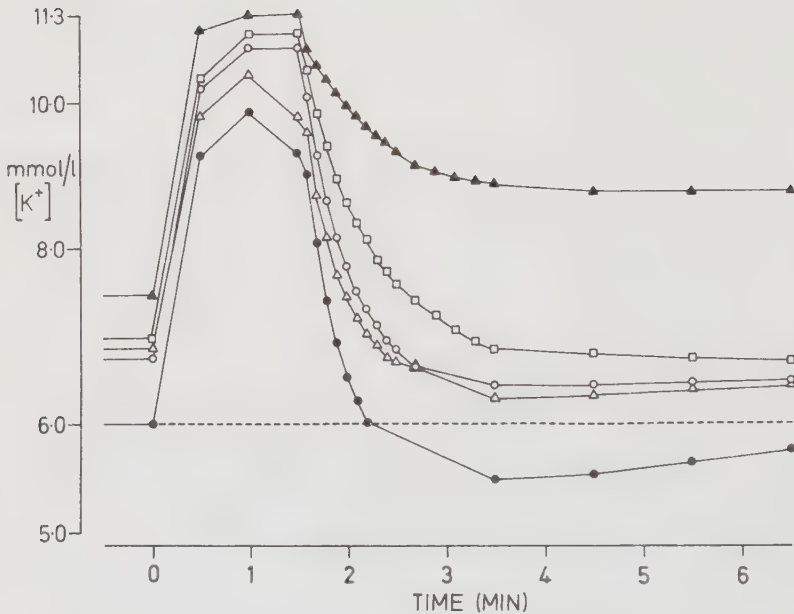


Abb. 13: Effekte von Ouabain auf die Kaliumruhekonzentration und stimulationsbedingten Kaliumveränderungen am Ganglion cervicale superius bei 25°C.

Das Ganglion wurde für 1,5 min mit 4 Hz orthodrom stimuliert (von 0 bis 1,5 min; s. Abszisse) unter Kontrollbedingungen (●) und unter Einwirkung von 30 (▲) 100 (○), 300 (◻) oder 1000 (◼) μmol/l Ouabain. Die Registrierungen sind aufeinandergezeichnet und zeigen eine dosisabhängige Zunahme der Kaliumruhekonzentration, des Kaliumanstiegs, eine deutlich verlangsamte Wiedereinstellung der Ruhekonzentration nach Beendigung der Reizung und eine Beseitigung der "undershoots" durch Ouabain.

Abb. 13 wurde bereits veröffentlicht (34).

Tabelle 3:

Die Effekte von Ouabain auf die Kalium-Ruhekonzentration, den Kalium-Anstieg während elektrischer Stimulation und $t_{1/2}$, die Zeit innerhalb derer Kalium die Ruhekonzentration nach Beendigung der Reizung zur Hälfte wieder erreichte. Teil A zeigt Ergebnisse vom Ganglion cervicale superius, Teil B vom Vagus. Die Stimulationsfrequenz ist in Klammern angegeben. Mittelwerte $\pm$ Standardfehler; $n \geq 3$;

37

37°C

25°C

A. SCG

	Ruhekonzentration (mmol/l)	Anstieg (4 Hz) (mmol/l)	$t_{1/2}$ (s)	Ruhekonzentration (mmol/l)	Anstieg (8 Hz) (mmol/l)	$t_{1/2}$ (s)
Kontrolle	6,0	9,1 $\pm$ 0,2	9 $\pm$ 1	6,0	7,7 $\pm$ 0,3	3 $\pm$ 1,0
30 μ M Ouabain	6,9 $\pm$ 0,2	10,2 $\pm$ 0,5*	11 $\pm$ 1***			
100 μ M "	7,0 $\pm$ 0,3	10,6 $\pm$ 0,4**	13 $\pm$ 2**			
300 μ M "	7,5 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 0,3***	25 $\pm$ 2***	7,0 $\pm$ 0,2	10,4 $\pm$ 0,8**	11 $\pm$ 0,8***
1000 μ M "	-----	10,4 $\pm$ 0,4*	62 $\pm$ 7***			

B. Vagus

		(8 Hz)		(8 Hz)
Kontrolle	6,0	6,7 $\pm$ 0,1	3 $\pm$ 1	6,7 $\pm$ 0,1
300 μ M Ouabain	6,1 $\pm$ 0,1	7,1 $\pm$ 0,2*	11 $\pm$ 2*	7,2 $\pm$ 0,3
				12 $\pm$ 1***

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

2.2. Lithium und Vanadium

Die Messungen der Kalium- und Calciumkonzentrationen mit den verwendeten Ionenaustauschern wurden durch LiCl nicht beeinträchtigt.

Die therapeutisch verwendete Konzentration von 1 mmol/l zeigte am Ganglion cervicale superius bei 25°C keine verifizierbare Wirkung, auch nicht nach mehrstündiger Applikation und bei modifizierter Zusammensetzung der Krebslösung.

Wie in Abbildung 14 dargestellt, verursachte die akute Applikation von 10 oder 30 mmol/l LiCl eine im Vergleich zur Kontrolle (linke Registrierung) angehobene Kaliumruhekonzentration und verringerte die Amplitude der "undershoots". Im Gegensatz zu Ouabain vergrößerte die getesteten Lithiumkonzentrationen die reizbedingten Kaliumanstiege nicht. $t_{1/2}$ wurde kaum beeinflusst, eine geringe Verlängerung war nicht zu quantifizieren. 5 bis 15 min nach Beginn des Auswaschens mit normaler Krebslösung war der stimulationsbedingte Kaliumanstieg verkleinert und der "undershoot" gesteigert (rechte Registrierung).

Abbildung 15 vergleicht die Effekte akuter Lithiumapplikation auf die Kaliumruhekonzentration und die stimulationsbedingte Kaliumveränderung an Ganglion und Vagus. Signifikant war die Reduktion des Unterschwingens durch 10 und 30 mmol/l LiCl am Ganglion ($p < 0,02$). Die genannten Effekte waren am Vagus ebenfalls vorhanden, aber weniger deutlich ausgeprägt.

Na-Orthovanadat, ein präsumptiver Blocker der Na-K-Pumpe des Herzmuskels und der Niere (28; 43), rief am Nervus vagus bei 25°C in Konzentrationen von 0,001 bis 1,0 mmol/l auch nach mehrstündiger Superfusion keinen der charakteristischen Effekte hervor, die eine entsprechende Eigenschaft an diesem neuronalen Substrat belegen konnten.

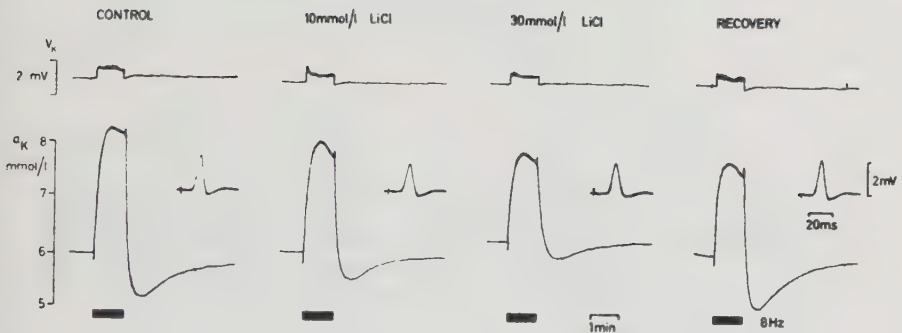


Abb. 14: Wirkung akuter LiCl-Applikation auf die Kationen-Ruhekonzentration, den reizinduzierten Anstieg und "undershoot" am Ganglion bei 25°C und Stimulation mit 10 Hz (Balken). Von links nach rechts sind dargestellt: Kontrollstimulation, Stimulation unter 10 mmol/l LiCl, unter 30 mmol/l LiCl und beim Auswaschen mit Krebslösung.

V_K ist das Referenzpotential der ionensensitiven Mikroelektrode. Die kleinen Bilder zeigen die Summenpotentiale des Ganglion cervicale superius, deren Amplitude unter Kaliumeinwirkung geringfügig verkleinert war.

Abb. 14 wurde bereits veröffentlicht (16).

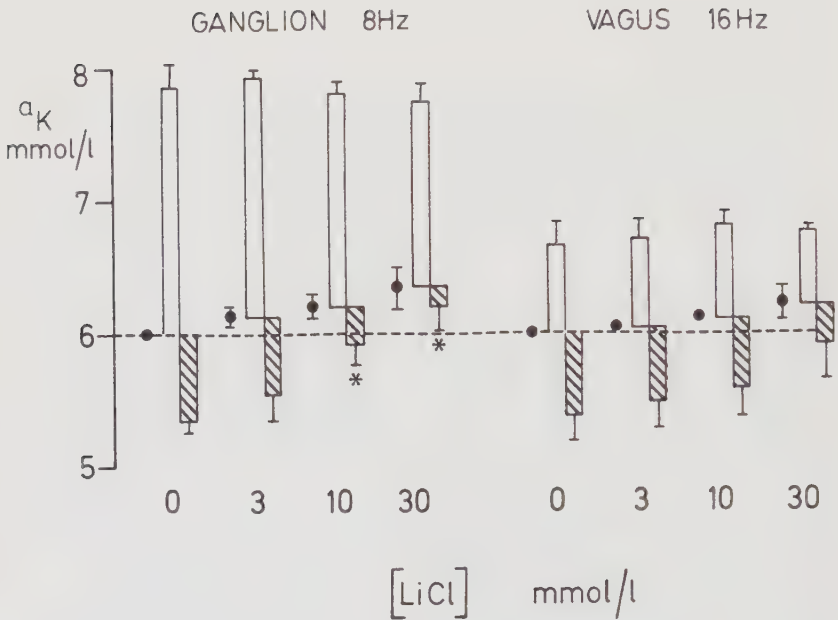


Abb. 15: Zusammenfassung der Effekte akuter Lithiumapplikation auf Ganglion und Vagus.

Die linke Graphik zeigt die Wirkung von 0, 3, 10 und 30 mmol/l LiCl auf die Kaliumruhekonzentration (o), den Kaliumanstieg (leere Balken) und "-undershoot" (schraffierte Balken) bei 25°C und einminütiger Stimulation des Ganglion cervicale superius mit 8 Hz.

Die rechte Graphik zeigt entsprechende Effekte am Vagus, der bei 25°C jeweils 1 min mit 16 Hz stimuliert wurde.

Mittelwerte $\pm$ Standardfehler; n=3.

Die Reduktion der "undershoots" am Ganglion war signifikant mit $p < 0,02$ (*) bei 10 und 30 mmol/l LiCl.

3. Pharmakologisch ausgelöste Veränderungen der interstitiellen Kationenkonzentrationen

3.1 Cholinerge Substanzen

Ergänzend zu der in Abschnitt 1 und 2 beschriebenen elektrischen Reizung, wurden die Effekte pharmakologischer Stimulation mit Carbachol und Pilocarpin am Ganglion cervicale superius untersucht.

Der ansonsten verwendete Kaliumionenaustauscher von Corning war zu diesen Messungen ungeeignet, da er aufgrund seiner Sensitivität gegenüber cholinergen Substanzen einen Potentialsprung zwischen Lösungen mit und ohne Carbachol anzeigte. Erst durch den Einsatz eines auf dem Valinomycin-Molekül basierenden Ionenaustauschers, der cholinergen Substanzen gegenüber nicht sensitiv ist (s. Tab. 1), war es möglich Kaliumveränderungen, die durch die pharmakologische Stimulation cholinergere Rezeptoren ausgelöst waren, direkt zu messen.

Die nicotinerge Substanz Carbachol wurde bei 25°C in Konzentrationen von 10 bis 1000 $\mu\text{mol/l}$ 2 bis 4 min auf das Ganglion appliziert. Abbildung 16A zeigt die Effekte von 300 und 1000 $\mu\text{mol/l}$ Carbachol. Den größten am Ganglion cervicale superius gemessenen Kaliumanstieg von 6 auf über 25 mmol/l bewirkten 1000 $\mu\text{mol/l}$ Carbachol. Gleichzeitig erfolgte eine Abnahme der interstitiellen Calciumkonzentration von 2,5 auf 2,3 mmol/l (das ist nicht mehr als nach einer elektrischen Reizung mit 4 Hz gemessen wurde; s. Abb. 1). 5 min nach Erreichen des Spitzenwertes begann ein prolongierter Kalium-"undershoot".

Die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 16B) zeigt ein maximales Ansteigen der interstitiellen Kaliumkonzentration von 6 auf 27 mmol/l und ein Absinken auf unter 3 mmol/l nach Applikation von 1000 $\mu\text{mol/l}$ Carbachol. Geringe Anstiege und "undershoots" wurden bereits durch 10 $\mu\text{mol/l}$ Ouabain hervorgerufen. Eine eindeutige Abnahme der Calciumkonzentration war erst bei Anwendung von mehr als 30 $\mu\text{mol/l}$ Carbachol messbar (ohne Abb.).

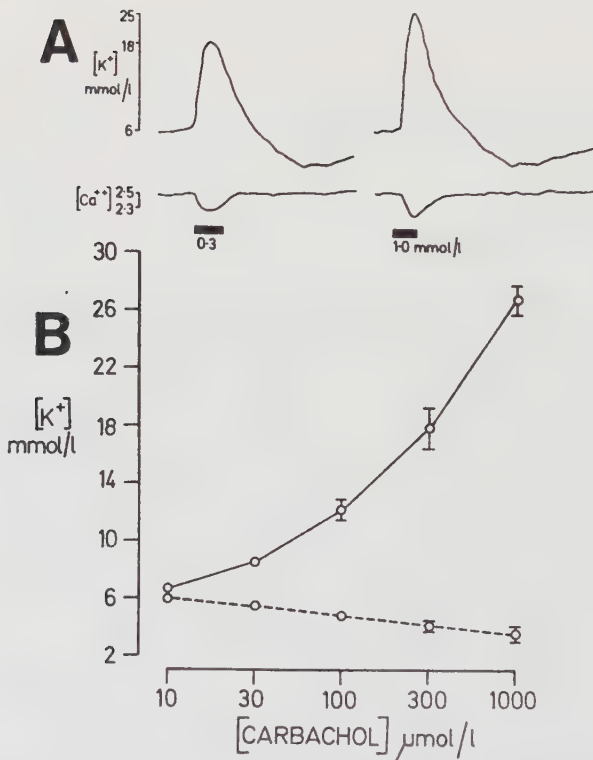


Abb. 16: A: Effekt von 0,3 oder 1,0 mmol/l Carbachol (Applikation s. Balken) auf die interstitiellen Kalium- und Calciumkonzentration am Ganglion bei 25°C. Die Kaliummessungen wurden mit Valinomycin-Elektroden durchgeführt.

Abb. 16: B: Dosis-Wirkungskurve der carbacholinduzierten Kaliumanstiege (—) und "undershoots" (----) am Ganglion bei 25°C. Mittelwerte $\pm$ Standardfehler; $n \geq 3$.

Alle Effekte des Carbachols waren auch nach Anwendung hoher Dosen voll reversibel nach Massgabe der angelegten Kriterien. Die Kationen kehrten zur Ruhekonzentration zurück und eine Wiederholung der Tests nach 60 min führte zu identischen Ergebnissen.

Pilocarpin, eine rein muskarinerge Substanz, führte in Konzentrationen von 0,001 bis 1,0 mmol/l zu keinen Veränderungen der interstitiellen Kationenkonzentrationen am Ganglion cervicale superius.

3.2 GABA

Zum Wirkungsvergleich an Ganglion und Vagus wurde GABA in Konzentrationen von 1 bis 300 $\mu\text{mol/l}$ bei 25°C auf beide Präparate appliziert.

In Abbildung 17A sind die Kaliumanstiege wiedergegeben, die am Ganglion bei 1,5-minütiger Anwendung von 10, bzw. 30 oder 100 $\mu\text{mol/l}$ GABA erfolgten. Die maximalen Kaliumwerte von 6,2, 6,6 und 6,8 mmol/l waren 30 s nach Beginn der Anstiege erreicht. Unabhängig davon, ob GABA weiter verabreicht oder ausgewaschen wurde, kehrte die interstitielle Kaliumkonzentration innerhalb von 2 bis 4 min nach Erreichen des Spitzenwertes zur Ruhekonzentration zurück, ohne diese deutlich zu unterschreiten. Veränderungen der interstitiellen Calciumkonzentrationen unter GABA waren nicht zu beobachten.

Wie die Dosis-Wirkungskurve (Abb. 17B) zeigt, wurden Veränderungen der interstitiellen Kaliumkonzentration am Ganglion bereits durch 1 $\mu\text{mol/l}$ GABA bewirkt. Am Vagus lag die Schwellenkonzentration zur Auslösung eines Kaliumanstieges bei 10 $\mu\text{mol/l}$. An beiden Organen wurden die größten GABA-induzierten Kaliumanstiege durch 100 $\mu\text{mol/l}$ angeregt, sie waren am Ganglion aber 4-fach größer als am Vagus, an dem nur ein Anstieg von 6,0 auf maximal 6,2 mmol/l nachweisbar war (Abb. 17C). Jeweils gleich große Effekte waren erst nach einer Auswaschphase von 20 min zu erzielen.

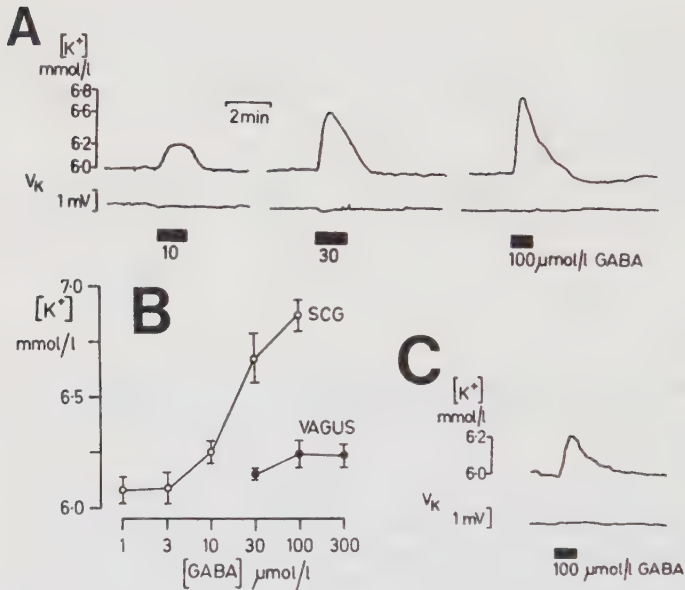


Abb. 17 A: Kaliumanstieg durch die Applikation von 10, 30 und 100 $\mu\text{mol/l}$ GABA (von links nach rechts; Balken) auf das Ganglion cervicale superius bei 25°C.

V_K ist das Referenzpotential.

Abb. 17 B: Dosis-Wirkungskurve der GABA-induzierten Kaliumanstiege an Ganglion (o) und Vagus (•) bei 25°C.

Abb. 17 C: Kaliumanstieg durch die Applikation von 100 $\mu\text{mol/l}$ GABA auf den Nervus vagus bei 25°C.

V_K ist das Referenzpotential.

D. DISKUSSION

1. Kurze Bemerkung zur Methode

Gegen ionensensitive Mikroelektroden wurde häufig der Einwand erhoben, sie würden lediglich die Ionenkonzentrationen in einem künstlich geschaffenen Hohlraum messen und nicht in funktionstüchtigen Mikrokompartimenten, wie etwa dem Periaxonalraum (59; 74; 119). Tatsächlich ist der Spitzendurchmesser der Mikroelektroden um ein Vielfaches größer als der Durchmesser des Interzellularspalt und ruft damit notwendigerweise eine Alteration der Mikroanatomie hervor. Aber selbst in einem traumatisierten Gewebsbezirk von 10 bis 15 μm Durchmesser (100) wäre eine diffusionsbedingte Verzögerung bis zur Einstellung eines Konzentrationsgleichgewichts an der Elektroden Spitze gering, nämlich kleiner als 70 ms, und die Registrierung langsamerer Veränderungen wäre dadurch nicht beeinträchtigt (74). Um die Zuverlässigkeit der Messungen mit ionensensitiven Mikroelektroden abzuschätzen, bietet sich ein Vergleich der vorliegenden Befunde mit Ergebnissen anderer Untersuchungsverfahren an.

Wegen ihrer hohen Kaliumleitfähigkeit verhält sich das Membranpotential der Gliazellen wie eine nahezu selektive Kaliumelektrode (65; 71; 88). Am Ganglion cervicale superius der Ratte zeigten Gliazellen ein Membranpotential von -80 bis -90 mV, das bei repetitiver elektrischer Stimulation mit 2 bis 8 Hz um 3 bis 20 mV abnahm (1; 6). Daraus errechnet sich ein interstitieller Kaliumanstieg von 6 auf 8 bis 10 mmol/l, der recht genau den direkt gemessenen Werten entspricht (s. Abb. 3).

Radioaktiv markierte Kationen wurden wiederholt zum Studium der intra/extrazellulären Elektrolytverteilung an Ganglion (12; 13; 105; 109) und Nervus vagus herangezogen (56; 95). Ein quantitativer Vergleich des stimulationsbedingten molaren Kationenaustausches zwischen Intra- und Extrazellulärraum mit Veränderungen der interstitiellen Ionenkonzentration wäre jedoch nur bei konstanten Volumina der Verteilungsräume legitim. Am Nervus opticus der Ratte (20; 96) und am sensomotorischen Cortex der Katze (22) wurde während der Erregung eine

Abnahme des Extrazellulärtraumes um 30 bis 50 % entdeckt. An Nervus vagus und Ganglion wurden, vermutlich aufgrund der besonderen Verhältnisse, entsprechende Untersuchungen noch nicht unternommen. Das Interstitium beider Präparate besitzt mit 30 bis 60 % einen wesentlich größeren Volumenanteil als dies bei Teilen des Zentralnervensystems der Fall ist. Dieses Volumen nimmt im Verlauf von in vitro Experimenten beständig zu (13; 56). Von einem gleichbleibenden Volumen des Interstitiums kann an Ganglion und Nervus vagus und Nervus opticus nicht ausgegangen werden. Trotz der eingeschränkten Vergleichbarkeit, die keine quantitativen Betrachtungen erlaubt, werden die Ergebnisse von Isotopenstudien im folgenden erwähnt.

2. Welche Strukturen beteiligen sich an einer stimulationsbedingten Kationenumverteilung ?

Eine Abnahme der interstitiellen Calciumkonzentration konnte in dieser Arbeit nur am Ganglion cervicale superius nachgewiesen werden und zwar nach elektrischer Stimulation (Abb. 3), Applikation von 50 mmol/l KCl (ohne Abb.) oder von Carbachol (Abb. 16). Am Nervus vagus war keine Veränderung der interstitiellen Calciumkonzentration zu verifizieren (Abb. 7).

Eine Umverteilung radioaktiv markierten Calciums war am Vagus nicht zu demonstrieren (56; 95), während nach elektrischer Reizung des Ganglion cervicale superius eine intrazelluläre Akkumulation von ^{45}Ca stattfand (105). Calcium wird hauptsächlich in die präsynaptischen Terminalen aufgenommen (54; 69; 70). Auch ein postsynaptischer Calciumeintritt infolge der Transmitterwirkung ist beschrieben (67; 64). Mikroelektrodenmessungen am Zentralnervensystem ergaben die größten Calciumabnahmen in Regionen höchster synaptischer Dichte (49; 82), erlaubten aber keinen definitiven Ausschluß axonaler Strukturen am Zustandekommen der veränderten Calciumkonzentrationen. Erst das Ausbleiben einer Calciumumverteilung am Nerven gestattet den Rückschluß daß auch an Ganglien und Zentralnervensystem synaptische Mechanismen alleinige Ursache stimulationsbedingter Veränderungen der interstitiellen Calciumkonzentration sind.

Veränderungen der interstitiellen Kaliumkonzentration können unabhängig von synaptischen Strukturen auftreten. Abbildung 18 illustriert die folgenden Punkte. Nervenfasern per se setzen während der Excitation Kalium frei. Das war zu erwarten aufgrund von Isotopenstudien am Kaninchenvagus, die eine Zunahme des Kaliumausstromes bei elektrischer Reizung anzeigten (56; 95). Die Depolarisation der Gliazellen am stimulierten Necturus-Sehnerven war ein weiterer Beleg (88).

Ein Vergleich der selektiven A- und B-Faser Stimulation des Nervus vagus mit der supramaximalen Stimulation von A-, B- und C-Fasern zeigte, daß die unmyelinisierten Fasern wesentlich mehr Kalium ins Interstitium freisetzen als die myelinisierten Fasern des Nervus vagus.

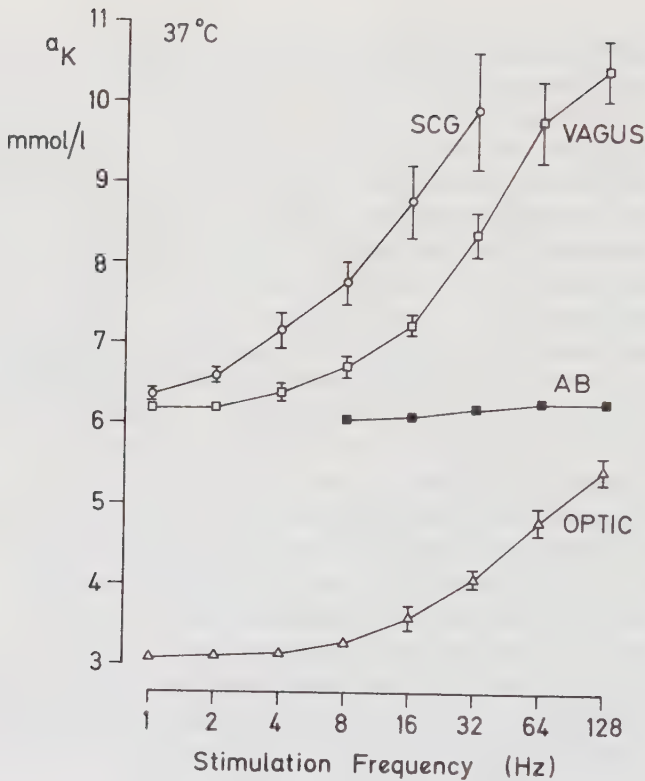


Abb. 18: Vergleich der Kaliumanstiege an Ganglion, Vagus und Opticus. Dargestellt ist die Beziehung von Stimulationsfrequenz (Abszisse) und Kaliumanstieg (Ordinate) bei elektrischer Reizung von Ganglion (o), Opticus (Δ) und A-, B- und C-Fasern des Vagus ($\square$) bei 37°C. Miteinbezogen wurden Kaliumanstiege bei Stimulation der A- und B-Fasern des Nervus vagus bei 25°C ($\blacksquare$). Mittelwerte $\pm$ Standardfehler; $n \geq 3$.
Abb. 18 wurde bereits veröffentlicht (39).

Dabei war nicht einmal auszuschließen, daß selbst die kleinen Kaliumanstiege, die während der Stimulation mit der niedrigen Reizspannung zu beobachten waren, auf der Erregung weniger C-Fasern beruhten, zu gering an der Zahl um eine C-Welle im Summenaktionspotential hervorzurufen. Da die myelinisierten A- und B-Fasern weniger als 10 % der gesamten Axone des Vagus ausmachen (17; 89), waren keine großen Kaliumanstiege zu erwarten. Der Nervus opticus, der einen sehr hohen Anteil myelinisierter Fasern enthält (32; 76), zeigte bei einer Reizfrequenz von 32 Hz einen Kaliumanstieg von 3 auf über 4 mmol/l (Abb. 9). Bei gleichen Reizbedingungen war am Vagus ein Anstieg von 6 auf über 8 mmol/l zu erzielen, also erfolgte an beiden Präparaten bezogen auf die Ruhekonzentration ein Anstieg um über 25 %. In den Versuchen mit variiert externer Kaliumkonzentration erwies sich die Amplitude des Kaliumanstiegs als nahezu umgekehrt proportional zur Ruhekonzentration (Abb. 5). Daraus folgt, daß von den unmyelinisierten Fasern des Nervus vagus bei einer Ruhekonzentration von 3 anstelle von 6 mmol/l und bei Reizung mit 32 Hz ein Kaliumanstieg von 50 % zu erwarten wäre. Die beschriebenen axonalen Erregbarkeitsänderungen bei unterschiedlichen externen Calciumkonzentrationen (Opticus 1,5 mmol/l CaCl_2 ; Vagus 2,5 mmol/l CaCl_2 ; (3; 36)) sind nach eigenen Ergebnissen bei supramaximaler elektrischer Stimulation ohne Einfluß auf die Amplitude des Kaliumanstiegs am Nerven (s. Abschnitt 1.2). Der Extrazellulärraum des Nervus opticus besitzt mit etwa 20 % (96) einen wesentlich kleineren Volumenanteil als der Extrazellulärraum des Vagus (56). Daher wäre wegen des geringen Verteilungsraumes am Opticus bei gleicher Kaliumfreisetzung ein wesentlich höherer Kaliumanstieg zu erwarten als am Vagus (6). Da trotz der niedrigeren Ruhekonzentration und trotz des geringeren Verteilungsraumes am Nervus opticus bei gleicher Reizfrequenz kleinere Kaliumanstiege als am Vagus auftraten, muß dieses Verhalten auf eine vergleichsweise niedrigere Kaliumfreisetzung aus den myelinisierten Fasern zurückgeführt werden. Dieser geringere Kaliumanstieg beruht entweder auf einer Kaliumundurchlässigkeit der Myelinscheide oder auf dem Fehlen von Kaliumkanälen an den myelinisierten Axonen. In "voltage clamp"-Experimenten konnte an myelinisierten peripheren Nervenfasern von Ratten (9) und Kaninchen (18) kein deutlicher "delayed-rectifier

current" nachgewiesen werden, d. h. während der Repolarisationsphase fand kein starker Kaliumausstrom ins Interstitium statt. Diese Befunde bieten eine plausible Erklärungsmöglichkeit für den geringen Beitrag der myelinisierten Fasern zu den registrierten Kaliumanstiegen.

Gering war der Effekt einer "antidromen" Stimulation des Ganglion cervicale superius durch den Nervus caroticus internus mit Kaliumanstiegen um maximal 0,1 mmol/l (Abschnitt 1.2). Da dieser Nerv auch Afferenzen zum Ganglion führt (90), wäre der Erfolg einer tatsächlich antidromen Reizung noch weit geringer. Am Rückenmark war entsprechend nur ein sehr kleiner Kaliumanstieg nach Vorderwurzelreizung nachgewiesen worden (14). Repetitive orthodrome Stimulation des Ganglion führte bei gleicher Frequenz zu größeren Kaliumanstiegen als die supramaximale Reizung des Nervus vagus. Die stärkere Kaliumfreisetzung beruht wahrscheinlich auf der Erregung präsynaptischer Axonterminalen und postsynaptischer Strukturen. Aus der deutlichen Reduktion des Kaliumanstieges durch 4 mmol/l $MnCl_2$ (38) konnte bereits auf eine erhebliche postsynaptische Kaliumfreisetzung bei orthodromer elektrischer Stimulation geschlossen werden. Einen eindrucksvollen Beweis für die postsynaptische Freisetzung liefern die enormen Kaliumanstiege auf beinahe 30 mmol/l bei der Einwirkung von 1000 μ mol/l Carbachol (s. Abb. 16). Carbachol wirkt als nicotinerge Substanz nur auf Neurone und zwar bevorzugt auf Dendriten und Somata, nicht aber auf Neuroglia (2). Mit radioaktiv markierten Ionen wurde bei 4-minütiger Applikation von 1000 μ mol/l Carbachol am Ganglion cervicale superius eine Abnahme der intrazellulären Kaliumkonzentration um 100 mmol/l und eine Zunahme der intrazellulären Natriumkonzentration gezeigt (12), die von einer maximalen ganglionären Depolarisation begleitet waren (10; 12). Die Dosis-Wirkungskurve des Kationenaustausches und der ganglionären Depolarisation (10; 12) entsprachen der oben gezeigten Kurve des interstitiellen Kaliumanstieges (Abb. 16B).

Eine ähnliche Parallelität besitzt die Dosis-Wirkungskurve des GABA-bedingten Kaliumanstieges an Ganglion und Nervus vagus (s. Abb. 17B) zu den beschriebenen Depolarisationen von Ganglion (5) und Nerv (11). GABA erhöht die neuronale Chloridleitfähigkeit am Ganglion cervicale superius (2). Der Kaliumausstrom ist vermutlich ein Sekundäreffekt zur Wahrung der Elektroneutralität während des neuronalen Chloridausstroms (22) und des GABA- und Natriumeinstroms in die Gliazellen (7). Ob die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Kaliumanstiege umgekehrt zu einer GABA-Freisetzung aus den Gliazellen führen können, bleibt fraglich (6). GABA beeinflusst die ganglionäre Transmission (57). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf einer Regulierung der ganglionären Transmitterfreisetzung durch zirkulierende GABA, der daher eine hormonartige Wirkung zugeschrieben wurde (53). Es bleibt unklar, ob GABA selbst ein Transmitter im peripheren Nervensystem ist (52). Der GABA-Rezeptor scheint eine ubiquitär vorhandene Komponente in der Membran von Neuronen und unmyelinisierten Nervenfasern zu sein (11).

Zusammenfassend bleibt festzustellen: Veränderungen der interstitiellen Calciumkonzentration entstanden an den getesteten Präparaten nur im Bereich von Synapsen also am Ganglion und nicht am peripheren Nerven. Kalium hingegen wurde sowohl bei der Stimulation des Ganglions als auch bei alleiniger axonaler Erregung freigesetzt, wie durch die Stimulation von Vagus und Opticus gezeigt werden konnte. Dabei führte die Reizung unmyelinisierter Fasern zu deutlicheren interstitiellen Kaliumanstiegen.

3. Welche Mechanismen führen zu einer Wiederherstellung der Kationenruhekonzentrationen ?

Die Kaliumanstiege an Ganglion, Nervus vagus und opticus kehrten nach Beendigung der elektrischen bzw. pharmakologischen Stimulation rasch zur Ruhekonzentration zurück, um diese danach zu unterschreiten. Die Größe dieser "undershoots" war sowohl von der Amplitude des vorangegangenen Kaliumanstiegs, als auch von der Stimulationsdauer abhängig (s. Abb. 6).

Als Ursachen des Unterschwingens sind sowohl passive Mechanismen, wie Diffusionsprozesse, als auch aktive Prozesse, also ein energieverbrauchender Kaliumtransport durch eine Ionenpumpe, zu diskutieren.

Eine während des Kaliumanstiegs erfolgte Abdiffusion von Kaliumionen aus dem Interstitium in die Superfusion würde nach Beendigung der Reizung in der Phase der Kaliumrückverteilung von dem Extra- in den Intrazellulärraum zu einem interstitiellen Kaliumdefizit führen. Insbesondere an Organen mit einer großen Oberflächen/Volumen-Relation ist ein derartiger Ionenaustausch mit der Krebslösung vorstellbar. Bezogen auf die Amplitude des Anstiegs waren die "undershoots" am Vagus meist größer als am Ganglion (s. Abb. 4), das einen größeren Durchmesser besitzt.

Da Kalium-"undershoots" auch an vollständig gegen Abdiffusion geschützten Präparaten, wie der Drohnenretina, auftraten (19) kann den Diffusionsvorgängen bei der Entstehung eines "undershoots" möglicherweise eine gewisse Bedeutung an Ganglion und Nerven zukommen, als alleinige Ursache kommen sie jedoch nicht in Betracht. Die auf den Fickschen Gesetzen beruhenden Diffusionsgleichungen reichten aus, um die Verteilung exogen zugeführten Kaliums im Interstitium des Gehirns zu erklären. Der rasche Konzentrationsabfall und "undershoot" nach stimulationsbedingten Kaliumanstiegen wurde aber erst durch einen zusätzlichen Term für einen aktiven Transport zutreffend beschrieben (21; 31; 47; 61; 62; 63; 74; 123). Am Zentralnervensystem (115), Ganglion cervicale superius (37) und am peripheren Nerven (103) konnte nach der neuronalen Excitation in der Phase des Unterschwingens ein gesteigerter Metabolismus mit einem

Anstieg des Sauerstoffverbrauchs, der Temperatur und einem Abfall der energiereichen Phosphate und Reduktionsäquivalente registriert werden.

Die Größe der "undershoots" (Abb. 4; 6) und Geschwindigkeit der Konzentrationsveränderungen zeigten in den vorliegenden Untersuchungen eine auffallende Temperaturabhängigkeit, die für enzymatische und nicht für Diffusionsvorgänge spricht. Die Wirkung von Ouabain und Lithium lieferten den deutlichsten Hinweis auf einen aktiven Prozess als Ursache der "undershoots".

Die verzögerte Rückkehr zur Ruhekonzentration und die Beseitigung der "undershoots" unter Ouabain (s. Abb. 12; 13; Tab. 3) beweisen die Beteiligung einer "Ouabain-hemmbar" Ionenpumpe an der Wiederherstellung der Ruhekonzentration an Ganglion und Nerv. Die Anhebung der Kaliumruhekonzentration und die größeren stimulationsbedingten Kaliumanstiege bei Ouabaineinwirkung zeigten, daß sowohl die Kontrolle der interstitiellen Kaliumruhekonzentration als auch die Limitierung der Kaliumanstiege durch eine ständig aktive Ionenpumpe erfolgen.

Der stimulationsbedingte Calciumabfall war unter Ouabain nur geringfügig verkleinert (s. Abschnitt 2.1). Im Unterschied zu früheren Untersuchungen am Cerebellum (15) konnte am Ganglion keine Verminderung der Calciumruhekonzentration unter Ouabain festgestellt werden.

Lithiumchlorid bewirkte ebenso wie Ouabain eine Anhebung der Kaliumruhekonzentration und hemmte die "undershoots" (s. Abb. 14; 15). Am Cerebellum der Ratte wurden nach akuter und chronischer Lithiumapplikation entsprechende Befunde registriert und als Hinweis auf eine pumpenblockierende Wirkung des Lithium bewertet (122). Dennoch ist ein in gewissen Punkten abweichendes Verhalten zu konstatieren. Die Rückkehr des Kaliums zur Ruhekonzentration wurde durch Lithium nicht nachweislich verzögert und die Kaliumanstiege waren nicht vergrößert. Die "undershoots" in der Auswaschphase waren gesteigert. Eine passive Freisetzung von Lithium anstelle von Kalium in der Repolarisationsphase (113) wäre wegen der raschen intrazellulären Lithiumakkumulation auch nach akuter Applikation (42; 120) denkbar und könnte den vergleichsweise kleinen stimulationsbedingten Kaliumanstieg erklären. Der genaue Wirkungsmechanismus des Lithium an der Na-K-Pumpe bleibt jedoch unklar. Für die therapeutische Wirksamkeit des Lithiums bei der Prophylaxe und

Therapie affektiver Psychosen (30; 110) sind eventuell sekundäre Effekte einer Pumpenblockade verantwortlich, wie etwa die Veränderung der neuronalen Erregbarkeit oder eine veränderte Transmitterfreisetzung (108; 125).

Über einen dritten Mechanismus, der neben Diffusion im Extrazellulärraum und aktivem Transport an der Neuronenmembran Bedeutung für eine Rückverteilung von Kationen innehaben könnte, nämlich die sogenannte "Gliapufferung" (65), kann durch Messungen mit einzelnen interstitiellen Mikroelektroden keine Aussage gemacht werden, da sich die möglicherweise durch diesen Mechanismus in die Gliazellen aufgenommenen Kationen der Registrierung entziehen. Für die Hypothese der "Gliapufferung", also die intrazelluläre Ionenumverteilung in einem Netz miteinander verbundener Gliazellen, wurden mit geeigneten Methoden detaillierte neue Beiträge geliefert (23). In Cortex (40) und Cerebellum (83) wurden so rasche Kaliumumverteilungen gemessen, die am ehesten durch eine Kaliumaufnahme in die Gliazellen und eine Ladungsverschiebung über sog. "gap-junctions" zwischen den Gliazellen zu erklären sind. Am Ganglion cervicale superius wurden die geforderten strukturellen Voraussetzungen dieses Vorgangs, die "gap-junctions", elektronenmikroskopisch festgestellt (27). Ein Beitrag dieses Mechanismus ist daher nicht auszuschließen.

Es ist festzuhalten, daß durch die Wirksamkeit von Ouabain und Lithium die Beteiligung aktiver Ionenpumpen an der Regulation der Kaliumruhekonzentration, der Limitierung des Kaliumanstiegs bei repetitiver elektrischer Stimulation und der Wiederherstellung der Ruhekonzentration nach Beendigung der Reizung an Ganglion und Vagus bewiesen wurde. Diffusionsvorgänge oder die "Gliapufferung" könnten vor allem unter natürlichen Verhältnissen bei der Erregung einzelner Axone und Neuronen eine Rolle spielen, deren Bedeutung aber nur durch weitere Untersuchungen unter geeigneten Bedingungen abzuschätzen sein wird.

4. Welche funktionelle Bedeutung könnten die gemessenen Veränderungen der interstitiellen Kationenkonzentrationen an Ganglion und Nerv besitzen ?

Veränderungen der interstitiellen Kationenkonzentrationen könnten die Grundlage einer intraganglionären Modulation autonomer Reflexe bilden. Am Ganglion cervicale superius bedingte die Reduktion der externen Calciumkonzentration von 2,5 auf 1,25 mmol/l eine Verkleinerung des reizinduzierten Kaliumanstiegs (s. Abb. 5). Zugrunde liegt wahrscheinlich eine verminderte synaptische Transmission durch einen kleineren Calciumeinstrom in die präsynaptischen Terminalen (45; 54; 69; 70). Außerdem wurde am Ganglion nachgewiesen, daß eine niedrigere intrazelluläre Calciumkonzentration die neuronale Kaliumleitfähigkeit und damit die Kaliumfreisetzung reduziert (77). Die Applikation von 50 mmol/l KCl führte am Ganglion zu den größten beobachteten Calciumabnahmen von 2,5 auf 1,9 mmol/l (s. Abschnitt 1.2). Derart hohe Kaliumkonzentrationen bewirken einen gesteigerten Transmitterrelease an den ganglionären Präsynapsen (106). Unter den genannten experimentellen Bedingungen konnte eine Interaktion von Kalium und Calcium bei der Transmitterfreisetzung nachgewiesen werden. Calciumabnahmen bei repetitiver elektrischer Stimulation waren jedoch vergleichsweise gering (s. Abb. 3). Kaliumanstiege ähnlicher Größenordnung sind durch elektrische Stimulation und, wenn man von bestimmten pathologischen Phänomenen wie der sog "spreading depression" (82) und epileptischen Entladungen (49; 87) absieht, in vivo nicht annähernd erreichbar, da die interstitielle Kaliumkonzentration durch die Na-K-Pumpe in engen Grenzen kontrolliert wird und bereits bei einem extrazellulären Kaliumwert unter 20 mmol/l keine weitere Kaliumfreisetzung mehr erfolgt (s. Abb. 5). Grund für das Ausbleiben eines höherern Kaliumanstiegs ist wahrscheinlich eine spannungsbedingte Inaktivierung der Na-Kanäle mit der Folge einer kleineren Aktionspotentialamplitude und einem daher verminderten repolarisierenden Kaliumausstrom (88). Wegen der verhältnismäßig geringen Variation der interstitiellen Kaliumkonzentration um weniger als 1 mmol/l bei neuronaler Spontanaktivität (100) wurde die physiologische Bedeutung

der genannten Kaliumeffekte in Zweifel gezogen (116). Auch der interstitiellen Calciumkonzentration wurde die Rolle eines Indikators, höchstens Mediators neuronaler Prozesse zugeschrieben (81).

Anschließend an die kurze Bemerkung zur Methode ist dennoch darauf hinzuweisen, daß die repetitive Erregung einzelner Fasern ausreichen kann, um einen Kaliumanstieg von mehreren mmol/l unmittelbar im Periaxonalraum zu bewirken, während mit einer ionensensitiven Mikroelektrode nur ein Bruchteil dieses Anstiegs registriert werden kann. Durch hypothalamische oder physiologische Stimulation können unmyelinisierte postganglionär sympathische (50), somatisch mechanosensitive (51) und nociceptive (121) Axone mit Frequenzen von 20 bis 70 Hz erregt werden. Die afferenten C-Fasern zeigen bei fortgesetzter Stimulation rasche Ermüdungszeichen und einen Rückgang der Entladungsfrequenz (512; 121). Das ist am ehesten mit einer periaxonalen Kaliumakkumulation zu erklären und möglicherweise der Grund, weshalb unmyelinisierte Axone im Gegensatz zu A- und B-Fasern bevorzugt niederfrequente Entladungsmuster aufweisen.

Nach kurzen tetanischen Entladungen zeigen Axone ein komplexes Muster gesteigerter und verminderter Erregbarkeit. Diese Phänomene sind an C-Fasern und Axonterminalen am ausgeprägtesten. An ihnen dauert die Periode der Obererregbarkeit 50 bis 80 ms (4; 35; 98; 118). Die zugrundeliegende Membrandepolarisierung könnte Ausdruck eines periaxonalen Kaliumanstiegs und gleichzeitig Grundlage einer intraganglionären Reflexmodulation sein.

Unter bestimmten pathologischen Bedingungen, wie sie nach Nervenverletzungen oder bei demyelinisierenden Erkrankungen vorliegen, könnte ein axonaler "crosstalk" über Veränderungen der interstitiellen Kaliumkonzentration stattfinden, wie er bisher anzunehmen aber nicht zu beweisen war. Diese axonale Koppelung unmyelinisierter oder demyelinisierter Fasern ist möglicherweise Ursache der Kausalgie oder anderer Schmerzsyndrome, bei denen die strukturellen Voraussetzungen zu großen interstitiellen Veränderungen der Kationenkonzentrationen gegeben sind (97; 99; 101; 127).

5. Ausblick

Im vorangegangenen Abschnitt wurden anhand der vorliegenden Ergebnisse einige hypothetische Funktionen der interstitiellen Kalium- und Calciumkonzentrationen des peripheren Nervensystems besprochen, deren Bedeutung erst durch weitere Untersuchungen zu klären sein wird.

In einem ersten Schritt sollten die Veränderungen der interstitiellen Kationenkonzentrationen bei intakter Perineuralscheide an Ganglion und Nerven untersucht werden, um den Effekt dieser Diffusionsbarriere auf die Amplitude der interstitiellen Veränderungen der Kationenkonzentration zu studieren (8; 111). Das intakte Epineurium halbiert den Efflux von ^{42}K aus dem Ganglion cervicale superius (109). Unter diesen Bedingungen wären deutlichere Kaliumanstiege während repetitiver elektrischer Stimulation zu erwarten. Die nachfolgenden Kalium-"undershoots" wären kleiner, falls die Abdiffusion in die Krebslösung maßgeblicher Faktor für das Zustandekommen der "undershoots" während der Regenerationsphase ist. Spinalganglien wurden bereits in situ mit ionensensitiven Mikroelektroden untersucht (22). Sowohl das Ganglion cervicale superius, als auch der Nervus vagus sind dem in vivo Experiment aufgrund ihrer anatomischen Lage zugänglich. Die natürliche Aktivität einzelner ganglionärer Neurone (112) und geringe Unterschiede zwischen prä- und postsynaptischen Entladungsmustern (107) sind beschrieben. Eine Kombination der verwendeten elektrophysiologischen Techniken mit direkten interstitiellen Konzentrationsmessungen könnte Aufschluß geben über die eventuelle Bedeutung interstitieller Kationen als Mediatoren einer intraganglionären Modulation autonomer Reflexe. Erst eine simultane, extrazelluläre und intrazelluläre Konzentrationsmessung, wie sie etwa an der Drogenretina (20) beispielhaft gelungen ist, wird genauere quantitative Überlegungen gestatten.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Stimulationsbedingte Veränderungen der interstitiellen Kalium- und Calciumkonzentrationen wurden an Ganglion cervicale superius, Nervus vagus und Nervus opticus der Ratte mit ionensensitiven Mikroelektroden in vitro untersucht.
2. Repetitive orthodrome elektrische Stimulation führte am Ganglion zu einem Anstieg der interstitiellen Kaliumkonzentration von 6 auf 10 mmol/l bei gleichzeitiger Abnahme der interstitiellen Calciumkonzentration von 2,5 auf 2,2 mmol/l. Die interstitielle Calciumkonzentration des Nervus vagus blieb bei elektrischer Stimulation unverändert. Am Vagus erfolgte ein Kaliumanstieg von 6 auf 8,3 mmol/l und am Opticus von 3 auf 4,1 mmol/l. (Alle Angaben bezogen auf supramaximale Reizung mit 32 Hz bei 37°C).
3. Nach jedem Anstieg unterschritt die Kaliumkonzentration nach Beendigung der Stimulation den Ruhewert. Dieser "undershoot" war umso ausgeprägter je größer der vorausgegangene Anstieg und je länger die Stimulationsdauer. Ouabain (10 - 1000 $\mu\text{mol/l}$) und Lithium (3 - 30 mmol/l) bewirkten eine Erhöhung der Kaliumruhekonzentration und verminderten die "undershoots". Beide Effekte sind durch die Hemmung der Na-K-Pumpe zu erklären.
4. Die nicotinerge Substanz Carbachol (10-1000 $\mu\text{mol/l}$) führte am Ganglion zu Kaliumanstiegen von 6 auf über 25 mmol/l bei gleichzeitiger Calciumabnahme von 2,5 auf 2,3 mmol/l. Die Applikation von GABA (1 - 100 $\mu\text{mol/l}$) bedingte am Ganglion größere Kaliumanstiege (um maximal 0,8 mmol/l) als am Vagus.
5. Nach einer kurzen Bemerkung zur Methode wird in der Diskussion der Beitrag axonaler und synaptischer Strukturen zu den beobachteten interstitiellen Veränderungen der Kationenkonzentrationen erörtert. Am myelinisierten Opticus fand eine geringere Kaliumfreisetzung statt als am weitgehend unmyelinisierten Vagus und am Ganglion. Eine Calciumabnahme erfolgte nur am Ganglion und ist daher ein Ergebnis synaptischer und nicht axonaler Erregung. Eine Hemmung der Na-K-Pumpe durch Ouabain und Lithium beeinflusst die Kaliumrückverteilung nach Beendigung der Stimulation. Damit ist eine Beteiligung aktiver Prozesse an dieser Rückverteilung bewiesen. Intraganglionäre Reflexmodulation, Limitierung der Entladungsfrequenz unmyelinisierter Fasern, Veränderungen der axonalen Erregbarkeit und axonaler "crosstalk" werden als hypothetische Funktionen der interstitiellen Kationenkonzentrationen im peripheren Nervensystem angesprochen.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams, P.R., Brown, D.A.:
Some observations on electrically inexcitable cells
(neuroglia) in rat sympathetic ganglia.
Brit. J. Pharmacol. 51 (1974) 131-132 P
2. Adams, P.R., Brown, D.A.:
Action of GABA on sympathetic ganglion cells.
J. Physiol. 250 (1975) 85-120
3. Baker, P.F., Hodgkin, A.L., Ridgeway, E.B.:
Depolarization and calcium entry in squid giant axon.
J. Physiol. 218 (1971) 709-755
4. Blackman, J.G.:
Function of autonomic ganglia.
In: The peripheral nervous system.
Ed. Hubbard, J.I., Plenum Press (1974)
5. Bowery, N.G., Brown, D.A.:
Depolarizing actions of GABA and related compounds on rat superior
cervical ganglion in vitro.
Br. J. Pharmacol. 50 (1974) 205-218
6. Bowery, N.G., Brown, D.A., Marsh, S.:
GABA efflux from sympathetic glial cells: Effect of depolarizing
agents.
Appendix by Adams, P.R. Brown, D.A.:
J. Physiol. 293 (1979) 75-101
7. Bowery, N.G., Brown, D.A., White, R.D., Yamini, G.
(³H)-GABA uptake into neuroglial cells of rat superior cervical
sympathetic ganglia.
J. Physiol. 293 (1979) 51-74

8. Bradbury, M.W.B., Crowder, J.:
Compartments and barriers in mammalian peripheral nerve.
Proc. of the Phys. Soc. (1975) 12-13 P
9. Brismar, T.:
Potential clamp analysis of membrane currents in rat myelinated nerve fibers.
J. Physiol. 298 (1980) 171-184
10. Brown, D.A., Brownstein, M.J., Scholfield, C.N.:
Origin of afterhyperpolarization that follows removal of depolarizing agents from the isolated superior cervical ganglion of the rat.
Br. J. Pharmacol. 44 (1972) 651-671
11. Brown, D.A., Marsh, S.:
Axonal GABA-receptors in mammalian peripheral nerve trunks.
Brain Res. 156 (1978) 187-191
12. Brown, D.A., Scholfield, C.N.:
Changes of intracellular sodium and potassium ion concentrations in isolated rat superior cervical ganglion induced by depolarising agents.
J. Physiol. 242 (1974) 307-319
13. Brown, D.A., Scholfield, C.N.:
Movements of labelled sodium ions in isolated rat superior cervical ganglion.
J. Physiol. 242 (1974) 321-352
14. ten Bruggencate, G., Lux, H.D., Liebl, L.:
Possible relationship between extracellular potassium activity and presynaptic inhibition in the spinal cord of the cat.
Pflügers Arch. 349 (1974) 301-317

15. ten Bruggencate, G., Steinberg, R.:
Effects of Ouabain and adenosine on extracellular Ca^{++} and K^+ as measured with ion-selective microelectrodes in cerebellar cortex. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. Suppl. to Vol. 302 (1978) R 55 (219)

16. ten Bruggencate, G., Ullrich, A., Galvan, M., Förstl, H., Baierl, P.:
Effects of lithium application upon extracellular potassium in structures of the peripheral and central nervous system of rats. In: Progr. in enzyme- and ion-selective electrodes (eds. Lübbers, D.W., Acker, H., Buck, R.P., Eisenmann, G. Hessler, M. Simon, W). Springer, Berlin, New York (1981)

17. Causey, G., Hoffman, H.:
The relation between the Schwann cell and the axon in peripheral nerves.
J. Anat. 90 (1956) 1 ff.

18. Chiu, S.Y., Ritchie, J.M.:
Potassium channels in nodal and internodal axonal membrane of mammalian myelinated fibers.
Nature 284 (1980) 170-171

19. Coles, J.A., Tsacopoulos, M.:
Potassium activity in photoreceptors, glial cells and extracellular space in the drone retina: changes during photostimulation.
J. Physiol. 290 (1979) 525-549

20. Connors, B.W., Ransom, B.R., Kunis, D., Gutnick, M.J.:
Activity-dependent K^+ -accumulation in the developing rat optic nerve.
Science 216 (1982) 1341-1343

21. Cordingley, G.E., Somjen, G.:
The clearing of excess potassium from extracellular space in spinal cord and cerebral cortex.
Brain Res. 151 (1978) 291-306
22. Deschenes, M., Feltz, P.:
GABA-induced rise of extracellular potassium in rat dorsal root ganglia: An electrophysiological study in vivo.
Brain Res. 118 (1976) 494-499
23. Dietzel, I., Heinemann, U., Hofmeier, G., Lux, H.D.:
Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration.
Exp. Brain Res. 40 (1980) 432-439
24. Douglas, W.W., Ritchie, H.M.:
On excitation of non-medullated afferent fibers in the vagus and aortic nerves by pharmacological agents.
J. Physiol. 138 (1957) 31-43
25. Douglas, W.W., Ritchie, J.M.:
Mammalian nonmyelinated nerve fibers.
Phys. Rev. 42 (1962) 297-334
26. Eisenman, G.:
Theory of membrane electrode potentials: an examination of the parameters determining the selectivity of solid and liquid ion exchangers and of neutral ion-sequestering molecules.
In: Ion Selective Electrodes, ed. Durst, R.A.,
Natl. Bur. Stand. Spec. Publ. 314: 1-56 (1969)
27. Elfvin, L.G. und Forsman, C.:
Freeze fracture studies on mammalian sympathetic ganglia.
Neurosci. Lett. Suppl. I (1978) 186

28. Erdman, E.:
Kardiale Wirkungen von Vanadat.
Herz Kreislauf, 11. Jahrgang 10 (1979) 501-510

29. Erlanger, J., Gasser, H.S.:
Electrical signs of nervous activity.
Univ. of Pennsylvania Press., Philadelphia (1937)

30. Fieve, R.R.:
Lithium and affective disorders.
Rev. Neurosci. 3 (1978) 131-156

31. Fischer, R.S., Pedley, T.A., Prince, D.A.:
Kinetics of potassium movements in normal cortex.
Brain Res. 101 (1976) 223-237

32. Forrester, J., Peters, A.:
Nerve fibers in optic nerve of rat.
Nature 214 (1967) 245-247

33. Forssman, W.G.:
Studien über den Feinbau des Ganglion cervicale superius der Ratte.
I. Normale Struktur.
Acta Anat. (Basel) 59 (1964) 106 ff.

34. Förstl, J., Galvan, M., ten Bruggencate, G.:
Extracellular K^+ -concentration during electrical stimulation of rat
isolated sympathetic ganglia, vagus and opticus nerves.
Neurosci. 7 (1982) 3221-3229

36. Frankenhäuser, B., Hodgkin, A.L.:
Action of calcium on the electrical properties of squid axons.
J. Physiol. 137 (1957) 218-244

35. Frankenhäuser, B., Hodgkin, A.L.:
The after effects of impulses in the giant nerve fibers of loligo.
J. Physiol. 131 (1956) 341-376

37. Friedli, C.:
Kinetics and changes in pO_2 and extracellular potassium activity
in stimulated rat sympathetic ganglia.
Proc. of the third internal. symp. on oxygen transport to tissues.
In: Adv. in Exp. Biol. and Med.,
Plenum Press, New York (1978) p 94

38. Galvan, M., ten Bruggencate, G., Senekowitsch, R.:
The effects of neuronal stimulation upon extracellular K^+ and Ca^{++}
levels in rat isolated sympathetic ganglia.
Brain Res. 160 (1979) 544-548

39. Galvan, M., Förstl. J., ten Bruggencate, G.:
Extracellular K^+ activity during electrical stimulation of rat
sympathetic ganglia, vagus and opticus nerves in vitro.
In: Ion-selective microelectrodes and their use in excitable tissues.
(eds. Sykova, E., Hník, P., Vicklicky, L.)
Plenum Press, New York (1981), 201-204

40. Gardner-Medwin, A.R., Gibson, J.L., Willshaw, D.J.:
The mechanism of potassium dispersal in brain tissue.
J. Physiol. 293 (1979) 37-38 P

41. Goldstone, L.A.:
Basic ideas in statistics.
In: Essential sciences for clinicians.,
Eds. Tindall, V.R., Dodson, M.E., Gowenlock, A.H.,
Oxford, Blackwell Scientific Publ. (1981)

42. Grafe, P., Rimpel, J., Reddy, M.M., ten Bruggencate, G.:
Lithium distribution across the membrane of motoneurons in the
isolated frog spinal cord.
Pflügers Arch. 393 (1982) 297-301
43. Grantham, J.J., Glynn, I.M.:
Renal Na-K-ATPase: Determination of inhibition by vanadium.
Am. J. Physiol. 236 (1979) 530-535
44. de Groat, W.C.:
The actions of GABA and related amino acids on mammalian autonomic
ganglia.
J. Pharmacol Exp. Ther. 172 (1970) 384-396
45. Harvey, A.M., Macintosh, F.C.:
Calcium and synaptic transmission in sympathetic ganglia.
J. Physiol. 97 (1940) 408-416
46. Heinemann, U., Gutnick, M.J.:
Relation between extracellular potassium concentration and neuronal
activities in cat thalamus (VPL) during projection of cortical
epileptiform discharges.
Electroencephal. Clin. Neurophysiol. 47 (1979) 345-357
47. Heinemann, U., Lux, H.D.:
Undershoots following stimulus-induced rises of extracellular
potassium concentration in cerebral cortex of cat.
Brain Res. 93 (1975) 63-76
48. Heinemann, U., Lux, H.D.:
Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium
concentration in the cerebral cortex of cat.
Brain Res. 120 (1977) 231-249

49. Heinemann, U., Lux, H.D., Gutnick, M.J.:
Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity
in the cerebral cortex of the cat.
Exp. Brain Res. 28 (1977) 237-243
50. Horeysack, G., Jänig, W., Kirchner, F., Thümer, V.:
Activation and inhibition of muscle and cutaneous postganglionic
neurones to hindlimb during hypothalamically induced vasoconstriction
and atropine-sensitive vasodilation.
Pflügers Arch. 361 (1976) 231-240
51. Iggo, A.:
Cutaneous mechanoreceptors with afferent C-fibers.
J. Physiol. 152 (1960) 337-353
52. Jessen, K.R., Mirsky, R., Dennison, M.E., Burnstock, G.:
GABA may be a neurotransmitter in the vertebrate peripheral nervous
system.
Nature 281 (1979) 71-74
53. Kato, E., Morita, K., Kuba, K., Yamada, S., Kuhara, T., Shinka, T.
Matsumoto, I.:
Does GABA in blood control transmitter release in bullfrog
sympathetic ganglia ?
Brain Res. 195 (1980) 208-214
54. Katz, B., Miledi, R.:
A further study of the role of calcium in synaptic transmission.
J. Physiol. 207 (1970) 789-801
55. Katzmann, R., Pappius, H.M.:
Brain electrolytes and fluid metabolism.
Williams and Wilkins, Baltimore (1973)

56. Keynes, R.D., Ritchie, J.M.:
The movements of labelled ions in mammalian nonmyelinated nerve fibers.
J. Physiol. 179 (1965) 333-367
57. Kimura, T., Imamura, H., Hashimoto, K.:
Facilitatory and inhibitory effects of GABA on ganglionic transmission in the sympathetic cardiac nerve of the dog.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 202 (1977) 397-403
58. Kriz, N., Sykova, E., Ujel, E., Viklicky, L.:
Changes of extracellular potassium concentration induced by neuronal activity in the spinal cord of the cat.
J. Physiol. 238 (1974) 1-15
59. Kriz, N., Sykova, E., Viklicky, L.:
Extracellular potassium changes in the spinal cord of the cat and their relation to slow potentials, active transport and impulse transmission.
J. Physiol. 249 (1975) 167-182
60. Krnjevic, K.:
Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates.
Phys. Rev. 54 (1974) 418-540
61. Krnjevic, K., Morris, M.E.:
Extracellular accumulation of K^+ evoked by activity of primary afferent fibers in the cuneate nucleus and dorsal horn of cats.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 52 (1974) 852-871
62. Krnjevic, K., Morris, M.E.:
Correlation between extracellular focal potentials and K^+ potentials evoked by primary afferent activity.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 53 (1975) 912-922

63. Krnjevic, K., Morris, M.E.:
Factors determining the decay of K^+ potentials and focal potentials
in the central nervous system.
Canad. J. Physiol. Pharmacol. 53 (1975) 923-934
64. Kuba, K., Koketsu, K.:
Synaptic events in sympathetic ganglia.
Prog. Neurobiol. 11 (1978) 77-169
65. Kuffler, S.W., Nicholls, J.G.:
The physiology of neuroglial cells.
Ergeb. Physiol. 57 (1966) 1-90
66. Kuffler, S.W., Nicholls, J.G.:
From neuron to brain.
Sinauer Ass., Mass. (USA) (1976)
67. Kusano, K., Miledi, R., Stinnakre, J.:
Post-synaptic entry of calcium induced by transmitter action.
Proc. Roy. Soc. London, 189 (1975) 49-56
68. Larrabee, M.G., Horowicz, P.:
Oxygen consumption of excised sympathetic ganglia at rest and in
activity.
J. Neurochem. 2 (1958) 81-101
69. Lindl, T.:
Calcium ions and their relation to sympathetic ganglionic
transmission and to cyclic-AMP levels in isolated superior cervical
ganglion of the rat in vitro.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 86 (1979) 300 ff

70. Llinas, R.:
Calcium and transmitter release in squid synapse.
Society for Neuroscience Symposia,
Vol. 2: Approaches to the cell biology of neurons.
Eds. Cowan, W.M., Ferrendelli, J.J.:
Bethesda, Soc. Neurosci. (1977) 139-159
71. Lothman, E.W., Somjen, G.:
Extracellular potassium activity, intracellular and extracellular
potential responses in the spinal cord.
J. Physiol. 252 (1975) 115-136
72. Lux, H.D.:
Fast recording ion specific microelectrodes: Their use in
pharmacological studies in the CNS.
Neuropharmacol. 13 (1974) 509-517
73. Lux, H.D.:
Extracellular potassium in the CNS: Relation to excitability changes.
In: Brain Work, A. Benzon Symp. VII.
Munksgaard (1975) 172-181
74. Lux, H.D., Neher, E.:
The equilibration time course of $(K^+)_{\text{e}}$ in cat cortex.
Exp. Brain Res. 17 (1973) 190-205
75. Matthews, M.R.:
Ultrastructure of ganglionic junctions.
In: The peripheral nervous system.
Ed. Hubbard, J.I.,
Plenum Press, New York (1974)

76. Meyer-König, D., Treff, W.M., Schlote, W.:
Morphometrische Befunde zum submikroskopischen Aufbau des Sehnerven der Ratte.
Z. Zellforsch. 133 (1972) 249-265
77. Morita, K., Koketsu, K., Kuba, K.:
Oscillation of $(Ca^{++})_i$ -linked K^+ -conductance in bullfrog sympathetic ganglion cell is sensitive to intracellular anions.
Nature 283 (1980) 204-205
78. Narahashi, T.:
Neurotoxins: Pharmacological dissection of ionic channels of nerve membranes.
In: The Nervous System, Ed. Tower, D.B., Vol. 1: The basic neurosciences.
Raven Press, New York (1975)
79. Neher, E., Lux, H.D.:
Rapid changes of potassium concentration at the outer surface of exposed single neurons during membrane current flow.
J. Gen. Phys. 61 (1973) 385-399
80. Nicholson, C.:
Brain cell microenvironment as a communication channel.
In: The Neurosciences: Fourth Study Program. Eds. Schmitt, F.O., Worden, F.G.,
Pub. Cambridge, MASS (1978) MIT
81. Nicholson, C.:
Modulation of extracellular calcium and its functional implications.
Fed. Proc. 39 (1980) 1519-1523

82. Nicholson, C., ten Bruggencate, G., Stöckle, H., Steinberg, R.:
Calcium and potassium changes in extracellular microenvironment of
cat cerebellar cortex.
J. Neurophysiol. 41 (1978) 1026-1039
83. Nicholson, C. und Phillips, J.M.:
Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the
extracellular microenvironment of the rat cerebellum.
J. Physiol. 321 (1981) 225-257
84. Oehme, M.:
Beitrag zur Entwicklung ionensensitiver Mini- oder Mikroelektroden
und zu deren Meßtechnik.
Dissertation ETH 5953 (1977) Zürich, 133 Seiten
85. Oehme, M., Kessler, M., Simon, W.:
Neutral carrier Ca^{++} -microelectrode.
Chimia 30 (1976) 204-206
86. Oehme, M., Simon, W.:
Microelectrodes for potassium ions based on a neutral carrier and
comparison of its characteristics with cation exchanger sensor.
Annal. Chim. Acta. 86 (1976) 21-25
87. Oliver, A.P., Höffer, B.J., Wyatt, R.J.:
Interaction of potassium and calcium in penicillin induced interictal
spike discharge in the hippocampal slice.
Exp. Neurol. 62 (1978) 510-520
88. Orkand, R.K., Nicholls, J.G., Kuffler, S.W.:
Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells
in the central nervous system of amphibia.
J. Neurophysiol. 29 (1966) 788-806

89. Paintal, A.S.:
Vagal afferent fibers.
Ergeb. Physiol. 52 (1962) 76-156
90. Perri, V., Sacchi, O., Casella, C.:
Synaptically mediated potentials elicited by the stimulation of
post-ganglionic trunks in the guinea-pig superior cervical ganglion.
Pflügers Arch. 314 (1970) 55-67
91. Pick, J.:
The autonomic nervous system.
J.B. Lippincott Comp., Philadelphia (1970)
92. Ploeger, E.J.:
The effects of lithium on excitable cell membrane on the mechanism
of the sodium pump of non-myelinated nerve fibers of the rat.
Eur. J. Pharmacol. 25 (1974) 316-321
93. Ploeger, E.J., den Hertog, A.:
The effects of lithium on excitable cell membranes. II. The effect
on the electrogenic sodium pump of non-myelinated nerve fibers of
the rat.
Eur. J. Pharmacol. 21 (1973) 24-29
94. Prince, D.A., Lux, H.D., Neher, E.:
Measurement of extracellular potassium activity in cat cortex.
Brain Res. 50 (1973) 489-495
95. Rang, H.P. und Ritchie, J.M.:
The ionic content of mammalian non-myelinated nerve fibers and its
alteration as a result of electrical activity.
J. Physiol. 196 (1968) 223-236

96. Ransom, B.R., Connors, B.W., Kunis, D.:
Activity dependent K^+ -accumulation in rat optic nerve, a developmental study.
Neurosci. Abstract 291, 1 (1980) 901
97. Rasminsky, M.:
Physiology of conduction in demyelinated axons.
In: Physiology and pathobiology of axons. Ed. Waxman, S.G.
Raven Press, New York (1978) 361-367
98. Raymond, S.A., Lettvin, J.Y.:
Aftereffects of activity in peripheral axons as a clue to nervous coding.
In: Physiology and pathobiology of axons. Ed. Waxman, S.G.
Raven Press, New York (1978) 203-225
99. Richards, R.L.:
Causalgia, a centennial review.
Arch. Neurol. (Chic.) 16 (1967) 339-350
100. Richter, D.W., Camerer, H., Sonnhof, U.:
Changes in extracellular potassium during the spontaneous activity of medullary respiratory neurons.
Pflügers Arch. 376 (1978) 139-149
101. Ritchie, J.M., Rang, H.P., Pellegrino, R.:
Sodium and potassium channels in demyelinated and remyelinated mammalian nerve.
Nature 294 (1981) 257-259
102. Ritchie, J.M., und Straub, R.W.:
The hyperpolarization which follows activity in mammalian non-myelinated nerve fibers.
J. Physiol. 136 (1957) 80-97

103. Ritchie, J.M., Straub, R.W.:
The movement of potassium ions during electrical activity, and the kinetics of the recovery process in the non-myelinated fibres of the grayfish olfactory nerve.
J. Physiol. 249 (1975) 327-348

104. Roberts, E., Chase, T.N., Tower, D.B. (eds.):
GABA in nervous system function.
New York, Raven Press (1976)

105. Robinson, J.D., Kabela, E.:
Distribution of ^{45}Ca in the superior cervical ganglion of the cat.
J. Neurobiol. 8 (1977) 511-522

106. Sacchi, P., Perri, V.:
Some properties of the transmitter release mechanism at the rat ganglionic synapse during potassium stimulation.
Brain Res. 107 (1976) 275-289

107. Sato, A., Schmidt, R.F.:
Ganglionic transmission of somatically induced sympathetic reflexes.
Pflügers Arch. 326 (1971) 240 ff.

108. Schildkraut, J.J.:
Pharmacology - the effect of lithium on biogenic amines.
In: Lithium - its role in psychiatric research and treatment.
Eds. Gershon, S., Schopin, B.,
Plenum Press, New York (1973)

109. Scholfield, C.N.:
Movements of radioactive potassium in isolated rat ganglia.
J. Physiol. 208 (1977) 123-137

110. Schou, M.:
Pharmacology and toxicology of lithium.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16 (1976) 231-243

111. Shantaveerappa, T.R., Bourne, G.K.:
Perineural epithelium: A new concept of its role in the integrity
of the peripheral nervous system.
Science 154 (1966) 1464

112. Skok, V.I.:
Physiology of autonomic ganglia.
Igaku Shoin Ltd. Tokyo (1973)

113. Skou, J.C.:
Enzymatic basis for active transport of sodium and potassium across
the cell membrane.
Physiol. Revs. 45 (1965) 596-617

114. Smith, I.C.H.:
Electrogenic potential in rat C-fibres: Effects of lithium and
thallium.
J. Physiol. 294 (1979) 135-144

115. Somjen, G.:
Metabolic and electrical correlates of the clearing of excess K^+
in the cortex and spinal cord.
In: Porter: Studies in Neurophysiology.
Raven Press, Cambridge (1978) 181-201

116. Somjen, G.:
Extracellular potassium in the mammalian central nervous system.
Ann. Rev. Physiol. 41 (1979) 159-177

117. Somjen, G.G., Lothman, E.W.:
Potassium sustained focal potential shifts, and dorsal root potentials of the mammalian spinal cord.
Brain Res. 69 (1974) 151-157

118. Swadlow, H., Waxman, S.G.:
Activity dependent variations in the conduction properties of central axons.
In: Physiology and pathobiology of axons.
Ed. Waxman, S.G.
Raven Press, New York (1978) 119-202

119. Sykova, E., Orkand, R.K.:
Extracellular potassium accumulation and transmission in frog spinal cord.
Neurosci. 5 (1980) 1421-1428

120. Thomas, R.C., Simon, W., Oehme, M.:
Lithium accumulation by snail neurones measured by a new Li^+ -sensitive microelectrode.
Nature 258 (1975) 754-756

121. Torebjörk, H.E., Hallin, R.G.:
Identification of afferent C-units in intact human skin nerves.
Brain Res. 67 (1974) 387-403

122. Ullrich, A., Baierl, P., ten Bruggencate, G.:
Extracellular potassium in rat cerebellar cortex during acute and chronic lithium application.
Brain Res. 192 (1980) 287-290

123. Vern, B.O., Schuette, W.H., Thibault, L.E.:
(K)_o-clearance in cortex: A new analytic model.
J. Neurophysiol. 40 (1977) 1015-1023

124. Viklicky, L., Sykova, E., Kriz, N., Ujel, E.:
Post stimulation changes of extracellular potassium concentration
in the spinal cord of the rat.
Brain Res. 45 (1972) 608-611
125. Vizi, E.S.:
 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -activated adenosinetriphosphatase as a trigger in transmitter
release.
Neurosci. 3 (1978) 367-384
126. Walker, J.L.:
Ion specific liquid ion exchanger microelectrodes.
Anal. Chem. 43 (1971) 89-92 A
127. Wall, P.D., Devor, M.:
Physiology of sensation after peripheral nerve injury, regeneration
and neuroma formation.
In: Physiology and pathobiology of axons. Ed. Waxman, S.G.
Raven Press, New York (1978) 377-389

LEBENS LAUF

Am 17. November 1954 wurde ich als Sohn von Maria und Walter Förstl in München geboren.

Dort besuchte ich die Grundschule und trat in das Max-Planck-Gymnasium ein, an dem ich 1975 das Abitur ablegte.

1975/76 leistete ich Zivildienst im Städtischen Krankenhaus München-Schwabing.

Im Wintersemester 1976/77 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität das Studium der Medizin, das ich mit der III. Ärztlichen Prüfung 1982 abschloß.

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. ten Bruggencate,
Martin Galvan, Ph. D., Dr. Peter Grafe, Eva
Beuschel, Claudia Vogel und Christa Müller,
ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht
zustande gekommen wäre.

